

**ENTWICKLUNG DER
FRUKTOSE - 1 - PHOSPHAT - ALDOLASE
IN KULTIVIERTEN MENSCHLICHEN FIBROBLASTEN**

CHRISTINA BAYER

1986

*Diss
München*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0023

Aus der Dr. v. Haunerschen Kinderklinik
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. H.-B. Hadorn

Entwicklung der Fruktose-1-Phosphat-Aldolase
in kultivierten menschlichen Fibroblasten

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christina Bayer
aus München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Endres
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H.-R. Hadorn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.5.1986

Mein besonderer Dank für Ihre stets
freundliche Unterstützung gilt

Frau Dr. Y. S. Shin

Herrn Prof. Dr. W. Endres

sowie den hilfsbereiten Mitarbeitern

im Stoffwechsellabor der

v. Haunerschen Kinderklinik

Meinen Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINLEITUNG	
1.1	Bedeutung und Vorkommen der Fruktose	1
1.2	Halbwertszeit, renale Ausscheidung und Transport der Fruktose zur Leber	1
1.3	Stoffwechselwege der Fruktose und die daran beteiligten Enzyme	2
1.4	Erbliche Störungen im Fruktosestoffwechsel	6
1.4.1	Essentielle Fruktosurie	6
1.4.2	Fruktose-1,6-Diphosphatasemangel	6
1.4.3	Hereditäre Fruktoseintoleranz	7
1.4.3.1	Geschichtlicher Überblick	7
1.4.3.2	Die Symptome bei hereditärer Fruktoseintoleranz ...	7
1.4.3.3	Laborbefunde bei hereditärer Fruktoseintoleranz ...	10
1.4.3.4	Histopathologische Veränderungen	11
1.4.3.5	Diagnostik der hereditären Fruktoseintoleranz	11
1.4.3.6	Differentialdiagnose	12
1.4.3.7	Therapie der hereditären Fruktoseintoleranz	13
1.4.3.8	Prognose bei fruktosearmer Diät	13
1.4.3.9	Fruktose-1-Phosphataldolase-Mangel als Ursache der hereditären Fruktoseintoleranz	14
1.4.3.10	Sekundäre Hemmung von Enzymschritten bei Fruktose-1-Phosphataldolasen-Mangel	15
1.4.3.11	Heredität	17
1.5	Zusammenfassung der Fruktosestoffwechselstörungen..	18
1.6	Die Aldolasen-Isoenzyme	19
1.6.1	Ontogenetische Differenzierung des Aldolasenisoen- zymmusters	20
1.6.2	Veränderungen des Aldolasenisoenzymmusters während der Karzinogenese	21
1.6.3	Lokalisierung der Isoenzyme in Gewebsschnitten	22
1.6.4	Auswirkungen der Carboxypeptidase	22
1.6.5	Aldolase B - Boten - RNA und zellfreie Aldolase B - Synthese	23

1.6.6	Theorien zur Erklärung der herabgesetzten Aldolasenaktivität gegenüber F1P bei der hereditären Fruktoseintoleranz	24
1.7	Zielsetzung der Arbeit	26
2.	UNTERSUCHUNGSMATERIAL und METHODIK	
2.1	Untersuchungsmaterial	28
2.2	Methodik	32
2.2.1	Ziel und Überblick	32
2.2.2	Gewinnung von Fruktokinase aus Rattenleber	33
2.2.3	Messung der Fruktokinaseaktivität durch Synthese von C ¹⁴ -F1P aus C ¹⁴ -Fruktose	34
2.2.4	Präparation der DEAE-Cellulose	37
2.2.5	Proteinbestimmung	38
2.2.6	Die Synthese von radioaktivem Fruktose-1-Phosphat.	40
2.2.7	Trennung von radioaktiver Fruktose und radioaktivem Fruktose-1-phosphat	41
2.2.8	Nachweis von Fruktose-1-Phosphat	43
2.2.9	Aktivitätsmessung der F1P-Aldolase mit der radioaktiven Methode	43
2.2.9.1	Versuchsansatz	43
2.2.9.2	Die Ionenaustauschsäulenchromatographie zur Trennung des radioaktiven Glycerinaldehyds	45
2.2.9.3	Berechnung der Aldolasenaktivität	47
2.2.10	Chemikalien und Geräte	48
2.3	Enzymkinetik	50
3.	ERGEBNISSE	
3.1	Proteingehalt der Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer	55
3.2	Versuchsdurchgang 1	56
3.3	Versuchsdurchgang 2	57
3.4	Versuchsdurchgang 3	58
3.5	Versuchsdurchgang 4	59
3.6	Versuchsdurchgang 5	61
3.7	Versuchsdurchgang 6	62

	Seite
3.8 Zusammenfassung der wichtigsten Versuchsergebnisse	63
3.9 Tabellen und Abbildungen	66
4. DISKUSSION	82
5. ZUSAMMENFASSUNG	92
6. LITERATURVERZEICHNIS	93

1. EINLEITUNG

1.1 Bedeutung und Vorkommen der Fruktose

Die Fruktose ist ein wichtiger Bestandteil unserer Ernährung. Die durchschnittliche Zufuhr dieser Ketonhexose beträgt 50 - 100g am Tag(59, 11). Sie ist in Pflanzen weit verbreitet und kommt als freies Monosaccharid vor allem in Früchten und Gemüse sowie im Honig vor(12). Sie ist Teil des Disaccharids Saccharose, das aus einem Molekül Fruktose besteht und als Küchenzucker weite Verwendung zum Backen und Süßen hat(59). Inulin, als Polymer der Fruktose, kommt im Chicory und in süßen Kartoffeln vor. Sorbit, ein Zuckeralkohol, das als Bestandteil von Diabetikerschokolade und als Zuckerersatz in Infusionslösungen verwendet wird, wird in der Leber durch die Sorbitdehydrogenase zu Fruktose umgewandelt und als solche metabolisiert(1).

Fruktose stellt etwa $1/6$ - $1/3$ der gesamten Kohlenhydrataufnahme dar.

1.2 Halbwertszeit, renale Ausscheidung und Transport der Fruktose zur Leber

Die Halbwertszeit von Fruktose beträgt im Organismus eines gesunden Erwachsenen durchschnittlich 18 min; im Vergleich dazu, die der Glukose im Durchschnitt 43 min(11). Bei einer konstanten Infusionsrate von 0,5 , 1,0 und 1,5 mg/kg Körpergewicht/h wurden nur ca. 2,5 bis 5,7% der jeweiligen Dosis im Urin ausgeschieden(61). Die Fruktose wird im Tubulus aktiv rückresorbiert, wobei der Schwellenwert bei 10-20 mg/100 ml liegt. Die Fruktoseverwertung ist proportional der Fruktosekonzentration im Blut(11).

Die Fruktose wird aus dem Darmlumen mittels eines spezifischen Carriers absorbiert und wird über die V.portae zur Leber transportiert(59). Dort diffundiert sie frei

in die Zellen, so daß sie intra- und extrazellulär in etwa der gleichen Konzentration vorliegt(11).

Die Hauptkapazität des Fruktosestoffwechsels liegt in der Leber; doch auch andere Organe sind dazu fähig, wenn auch in geringerem Maße, wie der proximale Teil des Dünndarms und die Nierentubuli(59).

1.3 Stoffwechselwege der Fruktose und die daran beteiligten Enzyme

In Anwesenheit von ATP, Kalium- und Magnesiumionen wird die Fruktose an der ersten Position durch das verhältnismäßig spezifische Enzym Fruktokinase phosphoryliert(Abb.1, Reaktion 1). Fruktokinase reagiert weder mit Glukose noch mit einer anderen Aldose. Sie weist eine sehr viel höhere Aktivität als Gluko- und Hexokinase zusammen auf(11).

Fruktose-1-phosphat wird in D-Glyceraldehyd und Dihydroxyacetonphosphat durch die Aldolase gespalten(Abb.1 Reaktion 2). Es wurde festgestellt, daß die Leberaldolase 3 Reaktionen katalisiert:

1. Die Spaltung von Fruktose-1-Phosphat
2. Die Spaltung von Fruktose-1,6-diphosphat
3. Die Kondensation der Triosen zu Fruktose-1,6-diphosphat

Die Triosen können, indem sie in den Krebszyklus eintreten, zur Energiegewinnung oder aber, wieder zu Fruktose-1,6-diphosphat kondensiert, zur Glukose- oder Glykogenbildung genutzt werden(1).

Die Reaktionen 1 und 2 stellen den Hauptweg des Fruktosemetabolismus dar(1).

Es existieren drei mögliche Stoffwechselwege für D-Glyceraldehyd(59):

1. Die wichtigste Reaktion ist die Phosphorylierung von D-Glyceraldehyd zu D-Glyceraldehyd-3-phosphat

durch das Enzym Triokinase, welches im Cytoplasma lokalisiert ist. In der menschlichen Leber ist die Triokinase besonders aktiv. ATP stellt die Phosphatgruppe in dieser Reaktion (Abb. 1, Reaktion 3).

2. D-Glyceraldehyd wird durch die Aldehyddehydrogenase zu D-Glycerat oxidiert (Abb. 1, Reaktion 4), welches wiederum via Glyceratkinase zu Phospho-D-Glycerat verstoffwechselt wird (Abb. 1, Reaktion 5).
3. D-Glyceraldehyd wird durch Alkoholdehydrogenase zu Glycerin reduziert (Abb. 1, Reaktion 6), was die Phosphorylierung zu L-Glycerin-3-phosphat durch die Glycerinkinase nach sich zieht (Abb. 1, Reaktion 7). L-Glycerin-3-phosphat wird schließlich zu Dihydroxyaceton-phosphat oxidiert.

Die Phosphorylierung von D-Glyceraldehyd zu D-Glyceraldehyd-3-phosphat ist der Hauptstoffwechselweg. Diese Triokinase-reaktion besitzt einen sehr niedrigen K_m - Wert von etwa 0,01 mM. Es wird schätzungsweise 90% des Glyceraldehyds, das in der Leber aus Fruktose gebildet wird, auf diesem Wege metabolisiert (59).

Die Phosphattriosen können entweder in die Glykolyse oder in die Glukoneogenese eingeschleust werden (59).

Die Phosphorylierung von Fruktose-1-phosphat zu Fruktose-1,6-diphosphat durch das Enzym 1-Phosphofruktokinase (Abb. 1, Reaktion 8) spielt im Fruktosestoffwechsel eine untergeordnete Rolle. In Muskelextrakten scheint diese Reaktion in Anwesenheit von ATP und Magnesium zwar stattzufinden, doch auch im Muskel ist die Aktivität der Phosphofruktokinase von geringer Bedeutung (11).

Im Gehirn, in roten und weißen Blutzellen und im Fettgewebe, wird die Fruktose durch die Hexokinase zu Fruktose-6-phosphat phosphoryliert (Abb. 1, Reaktion 9). Diese Reaktion wird durch Glukose kompetitiv gehemmt, da

die Hexokinase eine ca. 100 mal größere Affinität zu Glukose aufweist. Sie läuft also bei Anwesenheit der Glukose sehr langsam ab. Bei Abwesenheit wird die Fruktose in den Erythrozyten und Leukozyten jedoch genau so schnell wie Glukose verstoffwechselt.

Eine schlechtere Verwertung der Fruktose findet man im Gehirn, da die Blut-Hirn-Schranke für Fruktose praktisch undurchlässig ist, so daß die Fruktose kaum an die Hirnzelle herankommt(12).

Im Fettgewebe ist der Fruktoseverbrauch von der Fruktosekonzentration im Medium abhängig. Eine Hemmung durch Glukose ist nicht zu erwarten, da der Hexose-Transport in die Zelle der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, was dazu führt, daß freie Glukose in den Zellen des Fettgewebes unter normalen Umständen nicht vorkommt. Für die Fruktose existiert ein spezifisches Transportsystem in die Zelle, welches unabhängig von Glukose und Insulin ist(11).

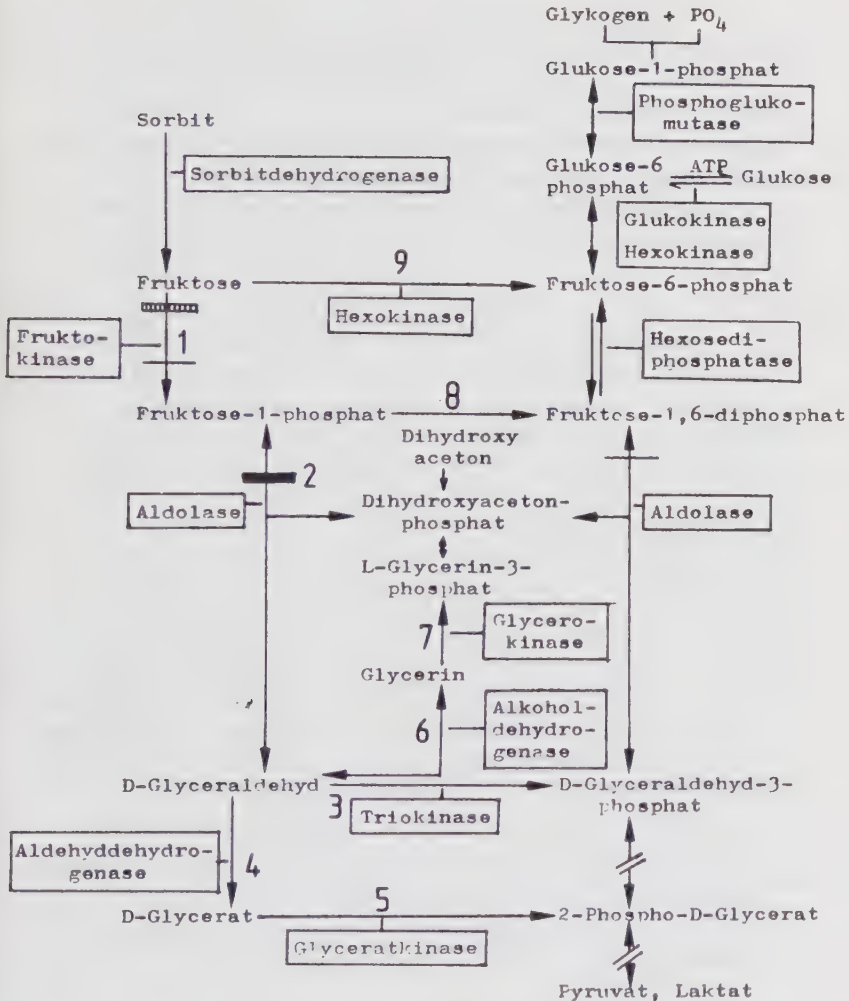


Abb.1: Enzymatische Reaktionen im Fruktosestoffwechsel

- Primärer Enzymdefekt und sekundäre Enzymhemmungen bei HFI
- - - Primärer Enzymdefekt bei essentieller Fruktosurie

1.4 Erbliche Störungen im Fruktosestoffwechsel

Es sind drei erbliche Störungen im Fruktose-Stoffwechsel bekannt:

1. Mangel an Fruktokinase: Essentielle Fruktosurie (EF)
2. Mangel an Fruktose-1,6-diphosphatase
3. Mangel an Fruktaldolase B: Hereditäre Fruktoseintoleranz (HFI)

1.4.1 Essentielle Fruktosurie

Die essentielle Fruktosurie wurde erstmals von ZIMMER im Jahre 1876 beschrieben(12). Sie ist eine harmlose, erbliche Stoffwechselstörung, die, da sie ohne klinische Symptome einhergeht, eigentlich nicht als Krankheit bezeichnet werden kann. Gekennzeichnet ist sie durch einen Mangel an Fruktokinase in Leber, Niere und Darmschleimhaut.

Die Diagnose der essentiellen Fruktosurie wird durch die Bestimmung der Fruktose im Blut und im Urin nach oralem oder intravenösem Fruktosebelastungstest gesichert. Normalerweise steigt die Fruktosekonzentration im Blut nicht über 30 mg% an, und nur Spuren von Fruktose werden im Urin ausgeschieden. Jedoch bei Patienten mit essentieller Fruktosurie erreicht die Fruktosämie 40 - 80 mg% und 10 - 20% der eingenommenen Fruktose erscheinen im Urin(1, 12). Da Fruktosezufuhr bei Patienten mit essentieller Fruktosurie zu keinerlei Symptomen führt, sind Diätmaßnahmen unnötig.

Die essentielle Fruktosurie wird autosomal rezessiv vererbt(1).

1.4.2 Fruktose-1,6-Diphosphatasemangel

Die Fruktose-1,6-diphosphatase ist ein Schlüsselenzym der Glukoneogenese, sodaß ihr Fehlen die endogene Bildung von Glukose aus Laktat, Alanin und Glycerin hemmt.

Zufuhr dieser Substrate oder Fruktose verursacht sofort eine Hypoglykämie und eine Laktatazidose. Akute Krankheitszustände sind unter Umständen lebensbedrohlich, können aber durch Infusion von Glukose und Bikarbonat sofort überwunden werden. Man vermutet, daß die Krankheit autosomal rezessiv vererbt wird.

Die Langzeittherapie besteht in häufigen Mahlzeiten und Vermeidung von Fruktose- und Sorbitzufuhr(1).

1.4.3 Hereditäre Fruktoseintoleranz

1.4.3.1 Geschichtlicher Überblick

Im Jahre 1956 wurde die hereditäre Fruktoseintoleranz erstmals von CHAMBERS und PRATT(5) als eine angeborene Stoffwechselkrankheit beschrieben, deren charakteristische Symptome nach Zufuhr von Fruktose Übelkeit, Erbrechen, Blässe, Tremor und Bewußtseinsstörungen bis zum Koma sind. FROESCH et al.(13) stellten 1957 vier Fälle von Fruktoseintoleranz innerhalb einer Familie vor, beschrieben Symptome dieser Krankheit und zeigten, daß die Zufuhr von Fruktose bei den Patienten eine Hypoglykämie hervorruft. Sie schrieben diese Tatsache dem Fehlen eines Enzyms im Fruktosestoffwechsel zu und postulierten, daß die Fruktoseintoleranz vererbt wird und von der essentiellen Fruktosurie klar abzugrenzen ist. HERS und JOASSIN(23) gelang es im Jahre 1961 zu zeigen, daß in Leberbiopsien von Patienten mit hereditärer Fruktoseintoleranz die 1-Phosphofruktaldolase-Aktivität deutlich verringert ist, was NIKKILÄÄ et al.(34) 1963 und FROESCH et al.(14) 1963 bestätigen konnten.

1.4.3.2 Die Symptome bei hereditärer Fruktoseintoleranz

Kinder und erwachsene Patienten mit hereditärer Fruktoseintoleranz sind vollkommen gesund und ohne Beschwerden, solange sie keine Nahrung zu sich nehmen, die Fruktose enthält(11). Die Fruktoseintoleranz tritt nach dem

Abstillen der Säuglinge als Krankheit in Erscheinung, d.h. in dem Augenblick, wo Saccharose der Säuglingsmilch beigemischt wird, oder erstmals Fruchtsäfte verabreicht werden(12, 14). Diese Kinder fallen schließlich durch Gedeihstörungen, lang andauerndes Erbrechen, sowie durch häufige Hypoglykämieanfälle auf, mit gelegentlicher Bewußtlosigkeit und Krämpfen, Hepatosplenomegalie, Gelbsucht, Albuminurie und Aminoazidurie. Kachexie kann schließlich zum Tode führen(11).

Bei allen Patienten mit einer derartigen Stoffwechselstörung führen Saccharose und Fruktose nach etwa 20 - 45 min zu akuten Symptomen, die auf eine Hypoglykämie zurückzuführen sind, deren Tiefpunkt bereits nach 45 - 90 min erreicht wird und die, je nach Menge der eingenommenen Fruktose, bis zu 9 Stunden dauern kann (12, 14). Die Veränderungen im Blutglukosespiegel unterliegen jedoch großen Altersunterschieden. Der Zeitpunkt des tiefsten Wertes scheint mit höherem Alter des Patienten später zu liegen. Kinder entwickeln die Hypoglykämie schneller und schon bei einer geringeren Dosis Fruktose als Erwachsene. Die Fruktosetoleranz steigt im allgemeinen mit den Jahren an. Die Patienten können kleine Mengen Fruktose zu sich nehmen, wie etwa ein Stück Orange oder einen halben Pfirsich(26). Auch die Art der Fruktoseaufnahme beeinflußt die klinischen Symptome. Wird die Fruktose intravenös injiziert, so treten Übelkeit und Erbrechen in den Hintergrund. Die intravenöse Dosis, die noch eine deutliche, aber ungefährliche Hypoglykämie und die typischen blutchemischen Veränderungen hervorruft, liegt bei 0,12 g/kg Körpergewicht beim Kind(12) und etwa bei 0,25 g/kg Körpergewicht beim Erwachsenen(11, 14). Oral verabreicht führt Fruktose bereits in kleineren Dosen zu Brechreiz, da der Zucker offenbar in höherer Konzentration in Kontakt mit der Darmschleimhaut kommt, die den gleichen

Enzymdefekt aufweist, wie die Leber(11, 14, 1). Ältere Kinder entwickeln eine große Abneigung gegen Süßigkeiten und schützen sich so selbst(11, 12, 26).

Wird Fruktose häufiger in kleinen Mengen konsumiert, so wird eine abgeschwächte, aber chronische Form von Fruktoseintoleranz beobachtet(26). Nach mehrtägiger Belastung kommt es zur Hepatomegalie, Hyperbilirubinämie, wobei ein Teil des Bilirubins nicht konjugiert ist, zu pathologischen Leberfunktionsprüfungen, Aszites, Aminoazidurie und außerdem zu einer Hypophosphatämie.

Sämtliche Veränderungen sind jedoch voll rückbildungsfähig. Die Intelligenz älterer Kinder und Erwachsener ist durchschnittlich(1, 11, 12, 14, 26). Die häufigen hypoglykämischen Anfälle scheinen keinen ernsthaften Hirnschaden zu verursachen. Die Funktionsstörungen von Leber und Niere sind offenbar reversibel, nachdem erwachsene Patienten keine manifesten Organschäden aufweisen(11, 14, 26). Erwähnenswert ist ferner, daß die Zähne der Patienten mit HFI in der Regel frei von Karies sind, was man wahrscheinlich auf die fruktose- und saccharosearme Ernährung zurückführen kann.

Die klinischen Manifestationen, die bei der hereditären Fruktoseintoleranz nach einmaliger(akut) oder wiederholter(chronisch) Fruktosezufuhr auftreten, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt(1, 11, 12, 14, 26, 59).

Tab.1: Symptome bei hereditärer Fruktoseintoleranz

Akute Symptome	Chronische Symptome
Schweißausbrüche	Gedeihstörungen
Tremor	Gelbsucht
Blässe	Hepatomegalie
Schwindel	Erbrechen
Übelkeit	Dehydration
Erbrechen	Ödeme
alle Grade von	Aszites
Bewußtseinsstörung	Oligurie, Anurie
bis zum Koma	Hämorrhagien
Tachypnoe	

Besonderheiten: Abneigung gegen Süßigkeiten
Fehlen von Karies

1.4.3.3 Laborbefunde bei hereditärer Fruktoseintoleranz

Nach Zufuhr von Fruktose kann man an Hand einer Reihe von Laborbefunden die Diagnose "hereditäre Fruktoseintoleranz" sichern(1, 11, 12, 34):

Tab.2: Laborbefunde bei Fruktoseintoleranz

Fruktosämie, Fruktosurie
Hypoglykämie
Hypophosphatämie
Hyperbilirubinämie
Hyperaminoazidurie
Hyperurikämie
Hypermagnesiämie
Erhöhter Spiegel von Aminosäuren
im Serum (Tyrosin, Methionin)
Erhöhter Serumspiegel von
Leberenzymen (z.B. GOT, GPT)
Verminderte Gerinnungsfaktoren

In der Regel wird mindestens ein Zeichen von Leberdysfunktion bei HFI - Patienten festgestellt. Am häufigsten weichen die Werte von Serumtransaminasen, Prothrombinzeit, Serumprotein und Methionin und/oder Tyrosin im Plasma von der Norm ab. Eine zweite Reihe von Tests deutet auf eine gestörte Nierenfunktion hin: Melliturie, Proteinurie, Hyperaminoazidurie und Azidose. Das Sinken von Serumphosphat und Kalium, Fruktosurie, organische Azidurie und metabolische Azidose spiegeln Störungen im Intermediärstoffwechsel wieder(1).

1.4.3.4 Histopathologische Veränderungen

Nach mehrtägiger Fruktosebelastung sind in einigen Organen der HFI - Patienten, besonders in der Leber, histopathologische Veränderungen zu beobachten:

Verfettung, Fibrose und Zirrhose der Leber wurden von mehreren Autoren beschrieben(26, 28, 59) und FAWCETT(2) berichtete über die Ähnlichkeit der Veränderungen bei Galaktosämie. Feingewebliche Untersuchungen mit dem Licht- und Elektronenmikroskop wurden erstmals von PHILLIPS et al.(37) durchgeführt. Am aufschlußreichsten waren Leberproben, die vor und nach Zufuhr von 50 mg Fruktose einem 27-jährigen Mann entnommen und untersucht wurden. Unter dem Elektronenmikroskop stellten sie myelinähnliche Einlagerungen, einen Mangel an glattem, endoplasmatischem Reticulum, cytolysosomähnliche Körper und eine Abnahme bzw. Verdünnung von Hyaloplasma in der Zelle fest.

1.4.3.5 Diagnostik der hereditären Fruktoseintoleranz

Bei Verdacht auf hereditäre Fruktoseintoleranz, auf Grund der detaillierten Ernährungsanamnese und dem klinischen Bild, sollte zuerst ein intravenöser Fruktosetoleranztest(FTT) durchgeführt werden. Die Fruktose wird am besten in einer einzigen, schnellen Injektion

verabreicht. Die Mindestdosis, die bei HFI - Patienten immer die typischen Symptome hervorruft, jedoch ohne Übelkeit und Erbrechen, liegt bei $0,25 \text{ g/kg}$ Körpergewicht(12) bzw. 3 g/m^2 Körperoberfläche(11) beim Kind (s.1, 11, 12, 14). Der orale FTT sollte wegen der schweren gastrointestinalen Symptome nicht angewandt werden. Die i.v. Zufuhr von Fruktose wirkt sich auf mehrere chemische Parameter aus(1, 11, 12, 34):

Die Blutglukose beginnt sofort zu sinken und erreicht in 45 - 90 min ihren tiefsten Wert. Dem Tiefpunkt des Blutzuckers geht der Abfall von Phosphat und der Anstieg von Laktat und Magnesium voraus. Gleichzeitig steigt die Fruktose im Blut auf sehr hohe Werte zwischen 40 - 140 mg% an und ungefähr 10% der Fruktose erscheint im Urin. Diejenigen Werte, die am empfindlichsten gegenüber Fruktosezufuhr und deshalb am besten zur Sicherung der Diagnose geeignet sind, sind die Blutglukose und der anorganische Serumphosphatspiegel. Ein betonter und anhaltender Abfall dieser beiden Werte ist die Regel. Man sollte betonen, daß das Sinken des anorganischen Phosphats dem der Glukose vorausgeht und bei kleinen Dosen Fruktose vielleicht sogar der einzige abnorme Befund ist. Die Fruktosekonzentration im Blut steigt nach intravenöser Zufuhr kleiner Mengen Fruktose nicht unbedingt an und sollte deshalb niemals gegen die Diagnose hereditäre Fruktoseintoleranz sprechen.

Eine weitere Möglichkeit zur Sicherung der Verdachtsdiagnose bietet die spectrophotometrische FIP-Aldolasenmessung in Leber- oder Dünndarmgewebe.

1.4.3.6

Differentialdiagnose

Da das Spektrum der Symptome breit gefächert und keinesfalls spezifisch ist, müssen bei der Verdachtsdiagnose "hereditäre Fruktoseintoleranz" eine Reihe anderer Krankheiten wie Stoffwechselkrankheiten(z.B. Glykogenosen), Hepatitis, Leberzirrhose oder Lebertumor in Betracht

gezogen werden. Eine Pylorusstenose oder Hiatushernie sind in Erwägung zu ziehen, wenn Erbrechen zum Leitsymptom wird. Die Septikämie oder intrauterine Infektion können klinisch dasselbe Bild aufweisen wie HFI, besonders wenn Gerinnungsstörungen und hämatologische Veränderungen im Vordergrund stehen. Auch das hämolytisch-urämische Syndrom sollte immer berücksichtigt werden(1).

1.4.3.7 Therapie der hereditären Fruktoseintoleranz

Steht die Diagnose "hereditäre Fruktoseintoleranz" fest, so muß mit der Behandlung sofort begonnen werden. Die Therapie beschränkt sich auf eine saccharose- und fruktosearme Diät(1, 11, 12, 34). Bis zu 1 g Fruktose täglich können bedenkenlos erlaubt werden. Früchte wie auch mit Saccharose zubereitete Süßspeisen müssen gemieden werden. Als Zucker für die Kleinkinder kommt Galaktose, Maltose und Glukose in Frage(12). Nach Zufuhr von Fruktose kann Glukose i.v. die Hypoglykämie beheben, doch bessern sich Übelkeit und Erbrechen erst viel später(14).

1.4.3.8 Prognose bei fruktosearmer Diät

Das Schicksal der Kinder hängt mit von der Aufmerksamkeit der Mütter ab, die anhand von Tabellen lernen, in welchen Nahrungsmitteln wenig Fruktose und Saccharose enthalten sind. In der Regel leiden die Erstgeborenen stärker unter der Krankheit als ihre Geschwister, denen die Erfahrung der Eltern und der Hausärzte dann zugute kommt. Wenn die Kinder die ersten Lebensjahre überstehen, ist die Prognose gut und in der Regel findet man keine bleibenden Hirn- oder Organschäden(12). Ältere Kinder entwickeln nämlich einen ausgeprägten Widerwillen gegen Süßigkeiten und Früchte und schützen sich so selbst gegen ihr Stoffwechselleiden(11, 12, 26). Diese

Abneigung gegen Süßes ist wahrscheinlich auf die unangenehmen Ereignisse zurückzuführen, die dem Genuß geringer Mengen Fruktose sofort folgen und es erklärt, warum das chronische Bild der Krankheit nur bei Kindern, nicht aber bei Erwachsenen in Erscheinung tritt.

Eine fruktosefreie Diät läßt in der Regel sämtliche Symptome in kürzester Zeit verschwinden, mit Ausnahme der Hepatomegalie, die oft viele Monate fortbestehen kann, obwohl die Lebergröße langsam abnimmt. Fettinfiltrationen der Hepatozyten wurden gelegentlich noch Monate nach Beginn der Diät beobachtet(2). In einigen Fällen garantierte das sofortige Streichen der Fruktose aus dem Ernährungs- oder Infusionsplan bei Säuglingen und Kleinkindern nicht für das Überleben(1). Hämorrhagien, als Folge einer Leberdysfunktion, können zu tödlichen Komplikationen führen(2).

1.4.3.9 Fruktose-1-Phosphataldolase-Mangel als Ursache der hereditären Fruktoseintoleranz

Der primäre Enzymdefekt bei der hereditären Fruktoseintoleranz ist ein Mangel an Fruktose-1-phosphat-Aldolase in der Leber. HERS und JOASSIN(23) bestimmten erstmals die Aktivität der F1P spaltenden Aldolase in den Lebern zweier Patienten mit HFI und fanden heraus, daß sie nur 4% der normalen Aktivität betrug. Von einer Reihe anderer Autoren wurde die Reduktion der Fruktose-1-phosphat-Aldolasenaktivität bestätigt, wobei jedoch die Ergebnisse in den einzelnen Untersuchungen quantitativ von 0 bis 12% variierten(11, 23, 34, 45). Als weiterer Ausdruck für die herabgesetzte Aldolasenaktivität wurde die Michaelis-Menten-Konstante von SCHAPIRA et al.(47) bestimmt, die 6x so hoch(15 - 30 mM) war wie der normale Wert(4 mM).

Auch ein Absinken der Aktivität der Fruktose-1,6-diphosphat-Aldolase auf 25% des Normalen wurde von HERS und

JOASSIN(23) berichtet. FROESCH et al.(14) fanden Aktivitäten von 55% - 87% vom Normalen. SCHAPIRA et al.(47) bestimmten schließlich das Aktivitätsverhältnis zwischen F-1,6-P₂-Aldolase und F1P-Aldolase, welches bei Gesunden etwa 1 betrug; bei HFI - Patienten jedoch größer als 6 war. Die Aktivität der Fruktokinase in der Leber ist bei hereditärer Fruktoseintoleranz normal(11, 14, 23, 45).

1.4.3.10 Sekundäre Hemmung von Enzymschritten bei Fruktose-1-Phosphataldolasen-Mangel

Die biochemischen Folgen des F1P-Aldolasenmangels illustriert Abb.1(S.5). Fruktosämie und Fruktosurie scheinen auf die Hemmung der Fruktokinase durch das Reaktionsprodukt zurückzuführen sein. Nach oraler oder intravenöser Zufuhr von Fruktose fällt außer der Blutglukose auch das anorganische Phosphat im Serum für mehrere Stunden auf sehr tiefe Werte ab, was bestätigt, daß die Fruktose zwar normal phosphoriliert, das entstandene Fruktose-1-Phosphat aber dann nicht gespalten werden kann(12). Obwohl die Fruktose über ATP und nicht direkt über anorganisches Phosphat phosphoriliert wird, muß die Leberzelle Phosphat aus dem Serum aufnehmen, wenn sich Fruktose-1-phosphat intrazellulär anhäuft und für den Stoffwechsel des Gewebes nicht verfügbar ist(11).

Das langsame Absinken des Blutzuckers, schon bevor der Fruktosespiegel hohe Werte erreicht, läßt vermuten, daß Insulin bei der Entstehung der Hypoglykämie keine Rolle spielt. DUBOIS et al.(9) stellten fest, daß der Glukose-Assimilationskoeffizient, welcher nach Insulinzufuhr ansteigt, abfiel, während sich eine fruktoseinduzierte Hypoglykämie entwickelte. Auch Glukagon, welches normalerweise der insulinbedingten Hypoglykämie durch Beschleunigung der Glykogenolyse in der Leber entgegenwirkt, vermochte nicht die Symptome der Patienten nachhaltig zu bessern(9, 45). Alles weist auf einen Block

in der Glukosefreisetzung aus der Leber hin, als Grund für die fruktoseinduzierte Hypoglykämie. Fruktose-1-phosphat hemmt zwei weitere Enzyme kompetitiv, nämlich die Phosphoglukomutase und die 1,6-Diphospho-Fruktaldolase(12). Damit ist der glykolytische Abbauweg, der die Grundlage des normalen Nachschubs von Glukose durch die Leber ist, blockiert. Die Leber kann weder aus dem Glykogen, noch durch die Glukoneogenese Glukose nachliefern. Auch der Entzug von anorganischem Phosphat und ATP kann die Änderungen im Energiestoffwechsel der Leberzelle verstärken. So ist es wahrscheinlich, daß bereits der erste Schritt der Glykogenmobilisierung wegen des Mangels an ATP gestört ist(12, 14).

Ebenso scheinen enzymatische Defekte des Dünndarms und der Nieren an diesem Leiden beteiligt zu sein. Das starke und anhaltende Erbrechen ist nicht ausschließlich durch die Hypoglykämie bedingt. Im Jejunum wird Fruktose durch die Fruktokinase zu Fruktose-1-phosphat phosphoryliert und durch die 1-Phospho-Fruktaldolase gespalten. Bei oraler Zufuhr von Fruktose fallen große Mengen zur Resorption durch die Darmschleimhaut an, was vielleicht zur Erklärung der schweren gastrointestinalen Symptome beitragen kann(59).

Da die proximalen Tubuli über den gleichen Fruktose-Abbauweg verfügen wie die Leber, werden oft auch sie bei hoher Belastung mit Fruktose geschädigt, was dann Aminoazidurie und leichte Albuminurie hervorruft(12).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Anhäufung von Fruktose-1-Phosphat sekundär mehrere Stoffwechselschritte hemmt:

1. Hemmung der Kethexokinase
2. Hemmung der Glykogenolyse
3. Hemmung der Fruktose-1,6-Diphosphat-Synthese via Aldolase
4. Hemmung der Umwandlung von Fruktose-6-Phosphat in Glukose-6-Phosphat

1.4.3.11

Heredität

Die Fruktoseintoleranz ist eine autosomal - rezessiv vererbte Störung(11, 12, 27, 38). Die Ergebnisse der meisten Familienuntersuchungen stimmen mit der Hypothese überein, daß ein autosomal-rezessiver Vererbungsmodus vorliegt; dies auf Grund folgender Kriterien:

1. Die Patienten gehören beiden Geschlechtern an
2. Ganze Sippen sind betroffen, wobei die Eltern und die direkten Nachkommen der Patienten immer gesund sind.

RAIVIO et al.(38) untersuchten 1967 zwei Elternpaare und eine Mutter von an HFI erkrankten Kindern und fanden völlig normale Ergebnisse hinsichtlich Fruktosetoleranztest und Aldolasenaktivität. Es ist bis heute nicht gelungen, die heterozygoten Träger der Krankheit zu erfassen, bei denen die Fruktose-1-Phosphat-Aldolase funktionell scheinbar völlig intakt ist.

1.5 Zusammenfassung der Fruktosestoffwechselstörungen

Tab.3: Vergleich der drei erblichen Störungen
im Fruktosestoffwechsel (n. BAERLOCHER, 1)

	Essentielle Fruktosurie	Hereditäre Fruktoseintoleranz	Fruktose-1,6-di- phosphatasemangel
Vorkommen	1 : 130.000	1 : 20.000	
Vererbungs modus	Autosomal rezessiv	Autosomal rezessiv	Autosomal rezessiv
Auftreten der Symptome	Nach Zufuhr v. Fruktose, Sorbit Saccharose	Nach Zufuhr von Fruktose etc.	Nach langem Fasten im Neugeborenenal- ter und während In- fektionen, nach Zu- fuhr von Fruktose
Symptome	Keine	Akut: Erbrechen Schweißausbrüche Tremor, Koma Krämpfe Chronisch: Gedehstörungen Erbrechen, Hepa- tomegalie, Gelb- sucht, Aszites, Ödeme, Hypogly- kämie, Krämpfe, Abneigung ge- gen Süßes	Hyperventilieren Apathie, Bewußt- losigkeit, Krämp- fe, Hepatomegalie Hypotonie
Laborbe- funde	Fruktosämie Fruktosurie	Fruktosämie, Fruk- tosurie, Hypogly- kämie, Hypophos- phatämie, Leber- dysfunktion, tu- buläres Syndrom	Hypoglykämie Laktatazidose Ketonkörper Hyperalanin- urie
Diagnose	Fruktose im Blut o. Urin nach Zufuhr	Fruktosetoleranz (0,2-0,3g/kg i.v.) Enzymaktivität in Leber oder Darm	langes Fasten Belastungstest (Fruktose, Glyce- rin), Enzymakti- vität in der Leber (Darm)
Therapie	Keine	fruktosearme Diät	fruktosearme Diät

1.6

Die Aldolasen - Isoenzyme

Die Aldolase, das Schlüsselenzym der hereditären Fruktoseintoleranz, kommt beim Menschen in den drei verschiedenen Isoenzymformen A, B und C vor(17, 46). Man kann sie durch die unterschiedliche Affinität gegenüber ihren beiden Substraten, Fruktose-1,6-diphosphat (FDP) und Fruktose-1-phosphat(F1P) unterscheiden(12). Ebenso sind Ladung, ihre immunologischen Eigenschaften und ihre Gewebsverteilung unterschiedlich(46). Aldolase A ist im Muskel vorherrschend und Aldolase B in der Leber. Die Aldolase C wurde 1966 von PENHOET et al.(36) aus Kaninchenhirn isoliert, wobei man sagen kann, daß das jeweilige Isoenzymmuster eher für bestimmtes Organgewebe charakteristisch ist, als auf Artenunterschieden zu basieren. Das Hauptmerkmal der Aldolase C ist ihre negative Ladung, wodurch sie leicht von den anderen Isoenzymformen durch die Elektrophorese getrennt werden kann(44). Die kinetischen Eigenschaften scheinen zwischen denen der Aldolase A und B zu liegen, wobei der FDP/F1P Quotient zwischen 5 und 10 liegt. Die Leberaldolase ist gegenüber F1P aktiver als die Muskelaldolase, da sie bei Substratsättigung FDP und F1P gleich schnell spaltet, so daß das Aktivitätsverhältnis ungefähr 1 beträgt, während die Muskelaldolase 50x aktiver gegenüber F-1,6-P bleibt(12). Andererseits ähneln sich die beiden Isoenzyme, zumindest innerhalb der Meßgenauigkeit, hinsichtlich der Zahl der Sulfhydrylgruppen pro Gramm Protein, dem Molekulargewicht, das durch Sedimentation und Diffusionsmessungen bestimmt wurde und auch hinsichtlich der elektrophoretischen Mobilität(47).

Alle Aldolasenisoenzyme sind Tetramere, d.h. sie sind aus vier Untereinheiten zusammengesetzt, welche sich auf mehrere Arten wieder kombinieren lassen, um Hybridformen zu bilden(11). In vitro lassen sich durch Dissoziation bei pH 2 und Reassoziaton aus je zweien dieser Grundformen je drei Hybride herstellen, z.B. $a_1 b_3$, $a_2 b_2$ und

a_1 , b_3 , die bei der elektrophoretischen Auftrennung zwischen den Rein-Enzymen liegen und auch in kinetischer Hinsicht Intermediäre darstellen(40). Antikörper, die gegen die reine Aldolase jedes Typs, a_4 , b_4 oder c_4 gerichtet sind, reagieren auch mit den jeweiligen Hybriden, was bedeutet, daß die drei Typen, trotz der gemeinsamen Struktur und der Ähnlichkeit ihrer aktiven Zentren, immunologisch verschieden sind(46).

Obwohl natürlich jede Spezies ihre eigene charakteristische Gewebsverteilung hat, kann in allen Wirbeltieren eine organspezifische Isoenzymverteilung beobachtet werden. Diese läßt eine Anpassung des Isoenzymmusters an spezifische physiologische Organfunktionen vermuten. In der Skelettmuskulatur aller Arten kommt fast ausschließlich die Aldolase A vor, die in geringen Mengen in fast allen Geweben vorhanden ist, sogar in der Leber. Die Aldolase B ist in Niere, Darm und bei den Säugetieren in hohem Maße in der Leber zu finden. Die Aldolase C hat eine große Gewebestreueung. So existiert sie u.a. in Gonaden, Milz und Blutzellen; in größeren Mengen wird sie jedoch prinzipiell im Gehirn gefunden(47).

1.6.1 Ontogenetische Differenzierung des Aldolasenisoenzymmusters

Zusätzlich zu dieser organ- bzw. gewebsspezifischen Verteilung ändert sich das Isoenzymmuster während der fetalen Entwicklung oder der Karzinogenese im jeweiligen Gewebe. Bisher konnte jedoch bei keinem der Isoenzyme ein Sinken der Enzymmenge pro Zelle beobachtet werden. Die Anpassung der Zelle an ihre metabolische Funktion zeigt sich in der Erhöhung der Synthese einer der drei Isoenzyme ohne Änderung in der Konzentration der anderen(54).

RENSING et al.(40) untersuchten die Veränderungen des Aldolasenisoenzymmusters mit Hilfe der Aktivitätsverschiebung gegenüber Fruktosediphosphat und Fruktose-1-

phosphat in Organextrakten der Ratte während der Entwicklung vom Foeten zum adulten Tier. In Leber, Niere und Gehirn erfolgt die Differenzierung von einer einheitlichen Aldolase in Richtung auf B- oder C-Aldolasen mit höherer Aktivität gegenüber F1P. Aktivitätsverhältnisse FDP/F1P, die den adulten gleichen, bilden sich in der Leber zur Zeit der Geburt, etwas später in der Niere und zuletzt im Gehirn. Im Hoden entsteht das adulte Enzymmuster erst während der Pubertät.

1.6.2 Veränderungen des Aldolasenisoenzymmusters während der Karzinogenese

Untersuchungen von Isoenzymen stellen auch einen qualitativen Zugang zu Enzymveränderungen bei bösartigen Tumoren auf dem molekularen Niveau dar. Oft äußern sich diese Veränderungen der Isoenzymverteilung in einem Rückschritt zum embryonalen Muster. Die ausgereifte Molekülform ist in der Abnahme begriffen, wobei die fetale Form jedoch zunimmt oder sogar dominiert, während sie im ausgereiften, normalen Gewebe nicht mehr vorhanden war(48). Obwohl der Verlust der gewebespezifischen Morphologie stärker ausgeprägt ist bei Tumoren, die mit größerer Malignität wachsen, konnte man bis jetzt keinen Zusammenhang feststellen zwischen der Rückentwicklung des Enzymmusters und der Invasivität des Tumors(10, 56).

Das hypernephroide Karzinom stammt von Zellen des proximalen Tubulus, welche ursprünglich vor allem Aldolase B, aber in geringem Maße auch Aldolase A enthielten. Während der Tumorentwicklung nimmt die Menge an Aldolase B ab, bei gleichzeitigem Anstieg von Aldolase A(56). Auch in Hepatomzellen wurde über ein Umschlagen des Isoenzymmusters von der Aldolase B zur Aldolase A berichtet(53). Fetalen Muskel, adulter Muskel, wie auch das Rhabdomyosarkom enthalten jedoch ausschließlich das Isoenzym A, sodaß hier der Aldolasentyp nicht zwischen

ausgereiftem und neoplastischem Gewebe unterscheidet, da beide Gewebe die unreife Form enthalten(10). Die Tatsache, daß beim Menschen die Aldolase A der vorherrschende Isoenzymtyp im undifferenzierten Gewebe ist, läßt die Vermutung zu, daß der Isoenzymübergang von Aldolase B zu Aldolase A während des Tumorstadiums den umgekehrten Prozeß darstellt, was einer Entdifferenzierung des Gewebes entspricht(39).

1.6.3. Lokalisierung der Isoenzyme in Gewebsschnitten

Um genauere Untersuchungen zur Zelldifferenzierung durchführen zu können, entwickelte WACHSMUTH(55) die "mixed aggregation immuno-cytochemical technique", auch Magic-Methode genannt, die dann auch von einer Reihe anderer Autoren(34, 39, 57) angewandt wurde. Diese Technik gestattet die genaue Lokalisation der Enzyme in Gewebsschnitten und besteht aus drei Schritten:

1. Der Gewebsschnitt wird mit Antiserum inkubiert
2. Der Gewebsschnitt wird mit dem löslichen, zu untersuchenden Enzym inkubiert
3. Das gewünschte Enzym wird markiert, wobei man eine konventionelle, zytochemische Methode anwendet

Der Antikörper hat zwei Antigenbindungsstellen und bindet sich mit der einen an das Gewebsantigen, mit der anderen an das lösliche Antigen, das im zweiten Inkubationsschritt zugefügt wurde.

Erstaunlicherweise wurde bei den Aldolasenisoenzymen in Rattenhirn und -niere eine Verstärkung der Enzymaktivität beobachtet, sobald die Enzyme durch Antigen-Antikörperkomplexe gebunden waren(55).

1.6.4 Auswirkungen der Carboxypeptidase

DRECHSLER, BOYER und KOWALSKY(8) haben berichtet, daß die Abspaltung von drei carboxyterminalen Tyrosinresten von der Muskelaldolase durch Carboxypeptidase die FDP-

Spaltungsaktivität auf etwa 5% des Normalwertes herabsetzt, ohne Verlust von F1P-Spaltungsaktivität. Das resultierende Enzym hat einen FDP/F1P-Quotienten, der ähnlich dem der Leberaldolase ist. In Übereinstimmung damit fanden RUTTER et al.(42), daß die Carboxypeptidase pro Mol Muskelaldolase etwa fünf Aminosäuren, nämlich 3 Tyrosinreste und 2 Alaninreste freisetzt. Im Gegensatz zum Muskelenzym spaltet die Carboxypeptidase nur 3 - 4 Aminosäuren pro Mol Leberenzym ab, davon sehr früh einen Tyrosinrest, der wahrscheinlich an einer carboxyterminalen Position liegt. Die Geschwindigkeit, aber nicht das Ausmaß des Aktivitätsverlustes gegenüber FDP, wird bei Variation des Aldolase-Carboxypeptidase-Quotienten geändert. Es existiert eine beinahe lineare Abhängigkeit zwischen dem Aldolasenaktivitätsverlust gegenüber FDP und der Freisetzung von Tyrosin. Eine minimale Aktivität ist erreicht, wenn die Tyrosinabspaltung bei einem Maximalwert von 3 Mol Tyrosin pro Mol Aldolase ist(8).

1.6.5 Aldolase B - Boten - RNA und zellfreie Aldolase B-Synthese

Um die Mechanismen der Aldolasensynthese genauer zu erforschen, war es nötig, möglichst reine messenger-RNA für jedes Isoenzym zu gewinnen, was TSUTSUMI et al.(53) mit Rattenleber gelang. Die Größe der Aldolase kodierenden m-RNA, die man aus freien und membrangebundenen Poly-somen isolierte, war ausreichend zur Synthese einer Untereinheit. Hierfür mußte die kodierende Region der m-RNA 1,080 Nukleotide betragen, da man für eine Aldolase-B-Untereinheit ein Molekulargewicht von 40.000 Daltons annimmt, was etwa 360 Aminosäuren entspricht. GREGORI et al.(17) gelang es zum erstenmal vollständige m-RNA auch aus kleinen Mengen menschlichen Gewebes zu gewinnen. Sie synthetisierten Aldolase mit Hilfe von m-RNA aus menschlicher Leber in einem zellfreien

Kaninchenretikulozyten - System. Das Molekulargewicht, immunologische Untersuchungen und die Tatsache, daß das Zufügen von antiproteolytischen Agentien die Größe der Aldolasenuntereinheit nicht verändert, identifizierten das neue synthetisierte Polypeptid als Aldolase B. Es zeigte sich außerdem, daß die Aldolase B-m-RNA-Aktivität in 6 Monaten intrauterinem Leben um mehr als das 10-fache steigt und sich bis zum Erwachsenenstadium nochmals um den gleichen Faktor erhöht. Damit ist bewiesen, daß der Anstieg der Leberaldolase B während der Entwicklung auf eine kontinuierliche Anhäufung der translatierbaren, spezifischen Boten-RNA zurückzuführen ist.

1.6.6 Theorien zur Erklärung der herabgesetzten Aldolasenaktivität gegenüber F1P bei der hereditären Fruktoseintoleranz

Zahlreiche Autoren stellten die unterschiedlichsten Theorien auf zur Erklärung der herabgesetzten Aldolasenaktivität gegenüber F1P bei der hereditären Fruktoseintoleranz.

FROESCH(12) stellte fest, daß sich bei HFI die Aldolase in der Leber, sowohl quantitativ als auch qualitativ vom normalen Enzym unterscheidet. Er hielt es deshalb für wahrscheinlich, daß die Synthese von Leberaldolase durch Mutation derartig beeinträchtigt wurde, daß das Enzym inaktiv ist oder völlig andere kinetische Eigenschaften besitzt.

RUTTER et al.(42) waren hingegen der Meinung, daß schon eine ganz kleine Veränderung auf molekularem Niveau für die hereditäre Fruktoseintoleranz entscheidend sei. Da sich die Leber- und Muskelaldolase in der Mehrzahl ihrer Eigenschaften sehr ähneln, hielt er es für möglich, daß allein die Anzahl und Stellung der carboxyterminalen Tyrosinreste für die unterschiedliche Aktivität der Leber-, Muskel- und HFI-Aldolase verantwortlich ist.

HERS und JOASSIN(23) vertraten die Theorie, nach der normalerweise ein fetales, nur FDP-spaltendes Enzym, nach der Geburt durch die reife Leberaldolase mit erweitertem Spezifitätsbereich ersetzt wird. Bei Patienten mit HFI entwickelt sich dieses adulte Enzym nicht; dafür behält die fetale Aldolase seine Aktivität, womit auch das Vorkommen einer vorübergehenden Fruktoseintoleranz bei neugeborenen Kindern erklärt wäre. SCHAPIRA et al.(47) bekräftigten die Hypothese von FROESCH et al.(12) indem sie, mit Antikörpern gegen Aldolase A bewiesen, daß der größte Teil der Aldolaseaktivität in Lebern von Kindern mit HFI auf Aldolase A zurückzuführen ist. Bei der hereditären Fruktoseintoleranz wäre also die Aldolase A ganz normal vorhanden, während die Mutante Aldolase B fast keine Aktivität aufweisen würde. Dies erklärt sowohl den erhöhten FDP/F1P Quotienten als auch die erniedrigte Affinität gegenüber F1P bei der HFI.

Auch GITZELMANN et al.(15) sprachen sich für eine strukturelle Gen-Mutation der Leberaldolase unter Beibehaltung ihrer immunologischen Eigenschaften aus. 1974 stellten sie fest, daß die elektrische Mobilität von Aldolase bei HFI und normaler Leberaldolase sehr ähnlich, die Wärmestabilität des HFI - Enzyms jedoch entscheidend herabgesetzt ist. Die alterierte Leberaldolase B konnte von diesen Autoren in drei von fünf Fällen durch Inkubation mit Antiserum von immunisierten Meerschweinchen reaktiviert werden, was eine genetische Variabilität zwischen den Patienten wahrscheinlich macht.

Auch SCHAPIRA(45) machte ähnliche Beobachtungen, wobei in drei von 45 Fällen das Ergebnis nach Behandlung mit Antikörpern über 25% der Norm lag.

1.7

Zielsetzung der Arbeit

Die hereditäre Fruktoseintoleranz ist bis heute eine der wenigen Stoffwechselkrankheiten, die hinsichtlich ihrer molekularen Mechanismen noch nicht völlig erforscht werden konnte. Die Ursache besteht vor allem darin, daß für eine Untersuchung Aldolase B-reiches Leber- oder Darmgewebe notwendig ist, das man durch Nadelbiopsien gerade in den Mengen gewinnt, wie sie zur Diagnosestellung mit der spectrophotometrischen Methode ausreichen. Versuche, auch auf zellulärer Ebene diesen Stoffwechseldefekt nachzuweisen, schlugen bisher fehl.

SHIN et al.(50) untersuchten mit einer spectrophotometrischen Methode die Aldolasenaktivität in Leukozyten und kultivierten Zellen von HFI - Patienten, den heterozygoten Eltern dieser Patienten und von gesunden Kontrollen. Obwohl es nicht gelang einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Aldolasenaktivität zwischen Patienten und Kontrollen zu messen, zeigte sich, daß das Aktivitätsverhältnis FDP/F1P in Fibroblasten sehr viel geringer war als in Leukozyten, Muskel- oder Hirngewebe, was dahingehend ausgelegt werden kann, daß die Aldolasenaktivität in Fibroblasten nicht nur auf das Isoenzym A oder C zurückzuführen ist. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß das Isoenzym A vor allem in fetalem Leber- und Nierengewebe sowie in Hepatom - Zellen(40, 48) vorkommt, gab die Studie von SHIN et al.(50) den Anstoß zu unseren Versuchen, da es uns möglich erschien, daß ältere Zellpopulationen proportional mehr Isoenzym B enthalten und der Unterschied in der Aldolasenaktivität zwischen Gesunden und HFI - Patienten in meßbare Bereiche rücken könnte.

Als Untersuchungsmaterial verwandten wir Fibroblastenkulturen, die sich während unterschiedlicher Zeiträume

von 2 - 15 Tagen im Inkubationsschrank differenzieren konnten. Um jedoch die Möglichkeit eines quantitativen Anstiegs von Aldolase B auf zellulärer Ebene untersuchen zu können, war eine spezifischere Methode notwendig. Wir führten deshalb die Aktivitätsmessung der F1P - Aldolase nach der erst kürzlich entwickelten radiometrischen Methode von SHIN et al.(49) durch.

2. UNTERSUCHUNGSMATERIAL und METHODIK

2.1 Untersuchungsmaterial

Hautfibroblasten wurden nach folgender Anleitung angezüchtet:

HAM - Nährmedium zur Kultur humaner Fibroblasten:

200 ml TC-Medium HAM F 10 (difco 5825, Ansatz ohne NaHCO_3 käuflich)

2 ml Antibiotic-Antimycotic-Lösung (Gibco 043-5240 D)

3,2 ml 8,4% NaHCO_3 (FRESENIUS)

30 ml fetales Kälberserum

Waschmedium:

Ansatz wie oben, doch statt fetalem Kälberserum

20 ml Neugeborenen - Kälberserum

PBS - Waschlösung

8g NaCl 1,37 mM

0,2g KCl 2,68 mM

1,15g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6,46 mM

H_2O ad 2 Liter

Kleine Hautstückchen gesunder Personen wurden auf das Nährmedium HAM in Flaschen aufgebracht; nachdem einzelne Zellen ausgesprossen waren, folgte die Abtrypsinierung und Subkultivierung der Zellen.

Atrypsinierung:

Mengenangaben für kleine/mittelgroße/große Flasche

(25 cm³ / 80 cm³ / 175 cm³)

Altes Medium abgießen

Mit 2 / 5 / 10 ml PBS waschen

2 / 5 / 10 ml Trypsin/EDTA(= Versen Trypsin) zugeben

10 min (evtl. kürzer) im Brutschrank inkubieren,
dabei die Flasche ab und zu bewegen

2 / 5 / 10 ml Waschmedium zugeben, gut mischen

Zellsuspension in Spitzglas überführen

10 min bei 600 U_{pm} (Hettich-Tischzentrifuge) zentrifugieren

Mediumüberstand abkippen

Das Zellpellet in 4 ml Kulturmedium resuspendieren

Suspension auf 2 neue Flaschen verteilen (je 2 ml),
in denen bereits 2 / 8 / 23 ml Kulturmedium vorgelegt
wurden

Zellen sofort durch Umschwenken gleichmäßig in der
Flasche verteilen

Im Brutschrank Schraubverschluß ca. 1/2 Umdrehung öffnen
Mediumwechsel in der Regel Montag und Freitag, mindestens
aber alle 7 Tage

Sobald die Zellen am Boden des Gefäßes zur Konfluenz
gekommen waren, wurde nach einem erneuten Abtrypsinie-
rungsvorgang die Zellsuspension auf zwei Flaschen ver-
teilt und wiederum bis zur Konfluenz kultiviert. Nach
der vierten Abtrypsinierung befanden sich insgesamt
14 Zellbehälter im Inkubationsschrank. Jeweils zwei
wurden nach unterschiedlichen Zeiträumen von 2 - 15 Ta-
gen weiterverarbeitet.

Nach Abgießen des Kulturmediums wurde zweimal mit phy-
siologischer Kochsalzlösung gespült, indem man etwas

NaCl in die Flasche gab, sie drehte und dann die Lösung zusammen mit dem restlichen Nährmedium und den abgestorbenen Zellen, abkippte. Hierauf gab man erneut ca. 3 ml physiologische Kochsalzlösung in die Behälter und kratzte mit einem "scraper", einem auf Draht aufgezogenen Silikonschlauch, den einschichtigen Zellrasen am Boden des Gefäßes ab. Das Zellen - Kochsalzgemisch wurde in vorher beschriftete Reagenzgläser gegossen. Diesen Vorgang wiederholten wir pro Behälter dreimal, so daß in jedem Reagenzglas am Ende ca. 9 ml Zellgemisch waren. Danach wurden die Gläser bei 1400 Umdrehungen pro Minute 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Gläser erneut mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Wir zentrifugierten ein zweites Mal unter denselben Bedingungen und gossen den Überstand erneut ab.

Nachdem wir zum Zellsatz jeweils 200 µl physiologische Kochsalzlösung zugegeben hatten, wurde die Suspension in 3 Eppendorfhütchen pro Reagenzglas, also insgesamt 6 Eppendorfhütchen, abpipettiert und bei -20° C eingefroren. Unter Berücksichtigung der Inkubationsdauer wurden sie mit den Kulturnummern I bis VII versehen (Abb.2).

Für jedes Experiment verbrauchten wir den Inhalt eines Eppendorfhütchens woraus sich ergibt, daß wir insgesamt 6 Versuchsdurchgänge durchführen konnten.

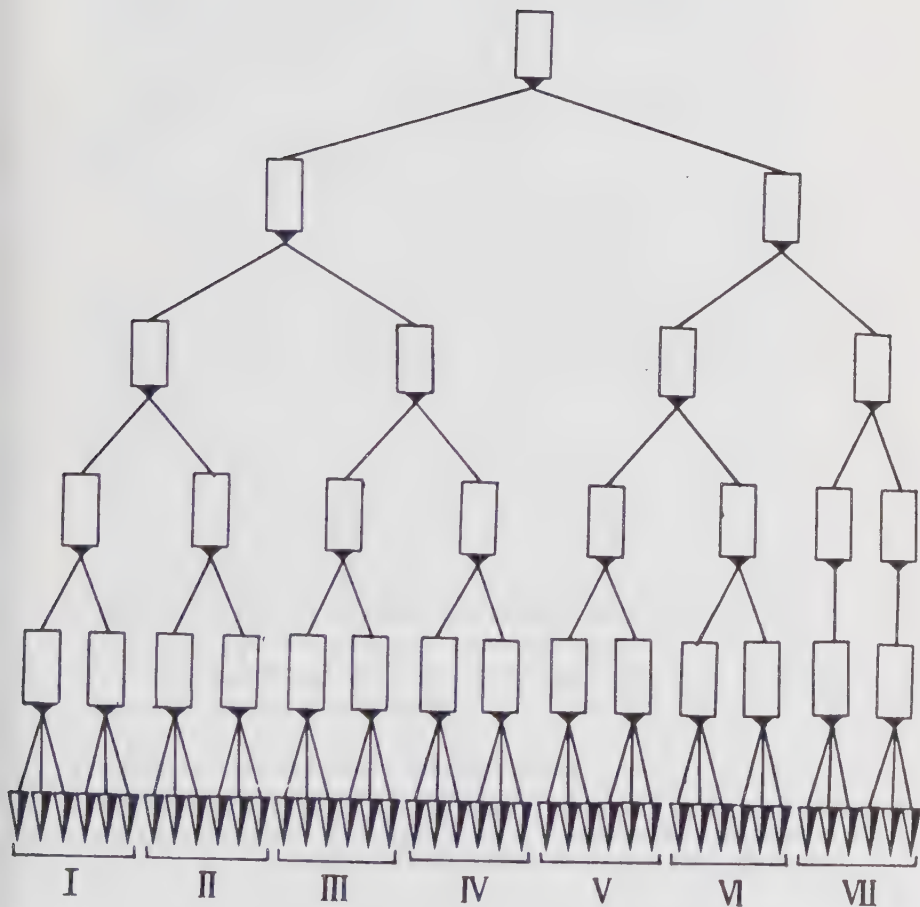
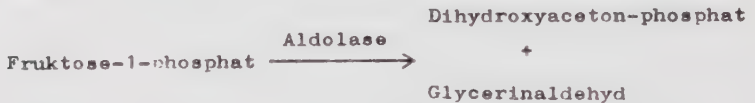


Abb.2: Kultivierung von Hautfibroblasten zur Gewinnung
des Untersuchungsmaterials

2.2 Methodik

2.2.1 Ziel und Überblick

Zur Messung der Aktivität der FIP - Aldolase wandten wir eine erst kürzlich entwickelte Methode nach SHIN et al.(49) an. Dieser Methode liegt folgende Reaktion zugrunde:



Bei Sättigung des Aldolasenenzym, d.h. bei einem Überangebot an Fructose-1-phosphat, ist die Menge an Reaktionsprodukt direkt proportional der Aldolasenaktivität pro mg Protein des Untersuchungsmaterials. Es genügt die Menge einer der beiden Triosen als Maß für die Aktivität der FIP-spaltenden Aldolase zu nehmen, da die Reaktionsprodukte Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd in einem Gleichgewicht stehen(49).

Zur quantitativen Erfassung muß man die Triosen zuerst anhand ihrer unterschiedlichen Ladungen trennen. Dies ist durch die Ionenaustauschsäulenchromatographie nach SHIN et al.(50) leicht möglich, da das Dihydroxyacetonphosphat durch seinen Phosphatanteil negativ geladen ist, während das Glycerinaldehyd neutral ist. Dabei findet sich die nicht umgesetzte Fructose-1-phosphat in derselben Elutionsfraktion wie Dihydroxyacetonphosphat, da auch sie durch den Phosphatanteil eine negative Ladung aufweist.

Nach radioaktiver Markierung kann man die Menge des entstandenen Glycerinaldehyds genau bestimmen, wobei man dazu radioaktive Fructose-1-phosphat herstellen muß. Da nur radioaktive Fructose im Handel erhältlich

ist, mußten wir uns die radioaktive Fruktose-1-phosphat selbst herstellen.



2.2.2 Gewinnung von Fruktokinase aus Rattenleber (nach STAUB und VESTLING, 52)

I. Fraktion:

1 g Rattenleber wird in 20 ml Kaliumphosphatpuffer 0,154 M, pH 7,6 homogenisiert.

II. Fraktion:

5 - 10 g Rattenleber werden in 150 - 300 ml eiskaltem Aceton (30 ml Aceton/g Leber) für 1 Minute von Hand homogenisiert, anschließend sofort mit Saugrahmen, zur schnellen Entfernung des Acetons, filtriert. Der Filterkuchen wird sogleich zerkleinert und dann über Vakuum mit P_2O_5 getrocknet. Das getrocknete Pulver ist bei -11°C mindestens 14 Tage haltbar und wiegt nur etwa 15% des nassen Lebergewichts.

Zur weiteren Enzymextraktion wird das trockene Leberpulver folgendermaßen verarbeitet:

Pro Gramm Pulver 20 ml eisgekühlten Kaliumphosphatpuffer 0,154 M, pH 7,6 hinzufügen. Diese Lösung bei 0°C eine halbe Stunde stehen lassen; anschließend 2.000 Upm 10 Minuten bei 0°C zentrifugieren. Den klaren Überstand behalten.

III. Fraktion:

Die Hälfte des Extraktes aus Fraktion II für 2 Minuten ins ca. 70°C heiße Wasserbad geben; danach sofort in

Eis kühlen, anschließend bei 0°C und 4.800 Upm 25 Minuten zentrifugieren. Den Überstand behalten. Auch die Hitzebehandlung wird zu dem Zweck durchgeführt, die Trennung des inaktiven Leberproteins von dem aktiven Enzym zu erleichtern. Nach STAUB und VESTLING(52) enthält die resultierende rotgelbe Flüssigkeit etwa 90% der Aktivität.

IV/1. Fraktion:

$3/4$ des Überstandes aus Fraktion III wird in einen Trennungstrichter gefüllt und über Nacht bei etwa -11°C eingefroren. Am nächsten Tag läßt man den gefrorenen Inhalt bei Zimmertemperatur auftauen, wobei sich ein stark rot gefärbter Teil der Lösung auf dem Trichtergrund absetzt. Diesen läßt man in ein Reagenzglas ablaufen, womit eine offensichtliche Trennung der Komponenten erreicht wird.

IV/2. Fraktion:

Trichterinhalt wieder einfrieren. Nach erneutem Auftauen den unteren Teil ablaufen lassen.

Letzte Fraktion:

Restliche, weniger dichte Portion des Systems, die etwa 90% der Enzymaktivität enthalten soll.

2.2.3 Messung der Fruktokinaseaktivität durch Synthese von C^{14} -FIP aus C^{14} -Fruktose

Herstellung des Gemisches:

1 Teil Kalium-Phosphat-Puffer	0,2 M; pH 7,6
1 Teil Magnesiumchlorid MgCl_2	0,32 M
1 Teil kalte Fruktose	10 M
1 Teil C^{14} -Fruktose	250 μCi
1 Teil ATP	1 g/10 ml

Ansatz:

50 µl Gemisch und je

50 µl der einzelnen Fruktokinasefraktionen

Zu jeweils 50 µl Enzymlösung werden 50 µl Gemisch in ein Eppendorfhütchen pipettiert; das Ganze wird auf dem Rüttler kurz gemischt und dann bei 37° C eine Stunde inkubiert. Anschließend wird die Reaktion sofort durch Erhitzen bei 95° C für fünf Minuten gestoppt. Die quantitative Auswertung erfolgt durch die Radioaktivitätsmessung mit Hilfe der Ionenaustausch-säulenchromatographie nach SHIN et al.(50)(s.2.2.9.2).

- 2 ml - Spritzen mit destilliertem Wasser gut aus-spülen
- Eine einfache Halterungsvorrichtung für die Säulen über einen Servo-Tray mit Szintillationsvials stellen, sodaß die in der Spritze befindliche Flüssig-keit direkt in ein bestimmtes Vial tropft(Abb.5,3.46)
- Die Säulen mit DEAE - Cellulose, Cl⁻Form 1,5 ml hoch packen
- Jeweils 70 µl des inkubierten Ansatzes vorsichtig auf eine Säule pipettieren; den Rest für den 100% - Wert sammeln
- Dreimal mit je 2 ml destilliertem Wasser nachspülen Die bisher abgetropfte Flüssigkeit verwerfen
- Neue Gefäße unter die Säulen stellen
- Zweimal mit 1,5 ml Salzsäure 150 mM spülen
- Die aufgefangene Lösung pro Vial mit jeweils 18 ml Quickszint mischen. Im Counter dann die Radioakti-vität zählen

100 % - Wert:

Die Reste der inkubierten Ansätze sammelt man in einem Eppendorfhütchen, mischt sie auf dem Rüttler durch und pipettiert 70 µl davon direkt in ein leeres Vial. Nach Zugabe von 18 ml Quickszint läßt man im Counter für mindestens zwei Minuten zählen.

Leerwert:

50 µl von der jeweiligen Fruktokinasefraktion werden bei 95° C fünf Minuten lang geheizt und danach in Eis sofort abgekühlt. Anschließend zentrifugiert man das Eppendorfhütchen kurz an, um die Kondenströpfchen wieder aufzufangen. Die so geheizte Enzymfraktion wird mit 50 µl Gemisch angesetzt.

Weiteres Vorgehen siehe oben!

Berechnungsformel für die Fruktokinaseaktivität

Einheit der Aktivität: nmol/min/mg Protein

$$\frac{\text{cpm} - \text{Leerwert}}{100\% \text{ cpm}} \times \text{Fruktose} \times \frac{1}{I} \times \frac{1}{\text{Protein}}$$

cpm = counts per minute

100% cpm = Gesamtaktivität in cpm

Fruktose = Endkonzentration der Fruktose in nmol

I = Inkubationszeit in min

Protein = mg Protein / ml der Fruktokinasefraktion

Bestimmung nach LOWRY et al. (31) (s.2.2.5)

2.2.4 Präparation der DEAE - Cellulose

- Die Cellulose in Pulverform wird in einer möglichst großen Menge destilliertem Wasser (ca. 25 ml/g Cellulose) aufgelöst, gut durchgerührt und dann stehen gelassen. Bei der Sedimentation sinkt der nutzbare, vernetzte Anteil der Cellulose schneller als die freien Feinpartikel, welche nach einer Weile dekantiert werden können.
- Das Sediment wird dreimal mit Aqua dest. gewaschen. Je öfter diese Prozedur durchgeführt wird, desto höher wird die erreichbare Durchflußrate und desto niedriger wird die resultierende Bindungskapazität sein.
- Um die Cellulose in die Basenform überzuführen, wird sie in 1 N NaOH (1 Teil Cellulose + 1 Teil 2 N NaOH) ca. 30 Minuten gerührt.
- Jetzt läßt man die Cellulose wiederum sedimentieren, was wegen ihres gequollenen Zustands wesentlich länger dauert als in H_2O . Das Sediment wird solange durch Auffüllen mit Aqua dest. und Absaugen des Überstands gewaschen, bis es den pH - Wert 7,0 erreicht hat.
- Nachdem die DEAE - Cellulose auf den für den Trennlauf gewünschten pH gebracht und mit H_2O äquilibriert worden ist, ist sie verwendbar.

Zur Vorbereitung der DEAE - Cellulose Cl - Form, gibt man statt 1 N NaOH 0,15 N HCl dazu und läßt sie eine Stunde rühren.

Danach läßt man sie sedimentieren und wäscht mit dest. Wasser wiederum bis zum neutralen pH - Wert. In der neutralen Form kann die Cellulose aufbewahrt werden.

2.2.5 Proteinbestimmung modifiziert nach nach LOWRY et al. (31)

Lösungen:

A = 2% Na_2CO_3 (wasserfrei) in n/10 NaOH

B_a = 5,5 g CuSO_4 / 100 ml

B_b = 1,35 g Seignettesalz / 100 ml
(Na - K - Tartrat)

Folin - Ciocalteus - Phenolreagenz

2% Na_2CO_3

Folgende Schritte sind entscheidend für das Zustandekommen einer meßbaren Farbreaktion:

— Das Protein reagiert mit Kupfer im alkalischen Milieu

— Das mit Kupfer behandelte Protein reduziert das Folin - Reagenz

Mischungen: (immer frisch ansetzen!)

I.	0,2 ml	B _b	II.	5,0 ml	A
	0,02 ml	B _a		0,1 ml	B
	0,22 ml	B		5,1 ml	C

Standard:

Wir verdünnten Rinderalbumin, das in einer Konzentration von 5 mg/ml vorlag, für den Test auf:

0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0 mg/ml

Arbeitsgang:

20 µl Probenlösung (zentrifugierter Überstand) und 250 µl frisches Kupferreagenz C in Eppendorfhütchen geben, mischen;

10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen
20 μ l Folin - Ciocalteus - Reagenz, 1 : 2
mit 2% Na_2CO_3 verdünnt, dazugeben
Sofort schütteln!

Leerwert:

Gleichbehandelter Ansatz mit Wasser statt mit Proben-
lösung

Ablesen am Photometer:

Mit Mikroschlitz bei 772 nm am Eppendorffphotometer mit
dem rot-empfindlichen Multiplier gegen Luft ablesen. Mit
einer 250 μ l - Pipette den gesamten Eppendorffhütchenin-
halt in eine Präzisionsküvette geben; bei jeder Messung
neu gegen Luft abgleichen; vorher den Inhalt der Küvette
absaugen und zweimal mit Aqua dest. nachspülen.

Aufzeichnen einer Standardkurve mit den Rinderserumalbu-
minwerten von 0,0 bis 1,0 mg/ml (Abb.3)

Ablesen der Probenlösungsproteinwerte an Hand der Stan-
dardkurve.

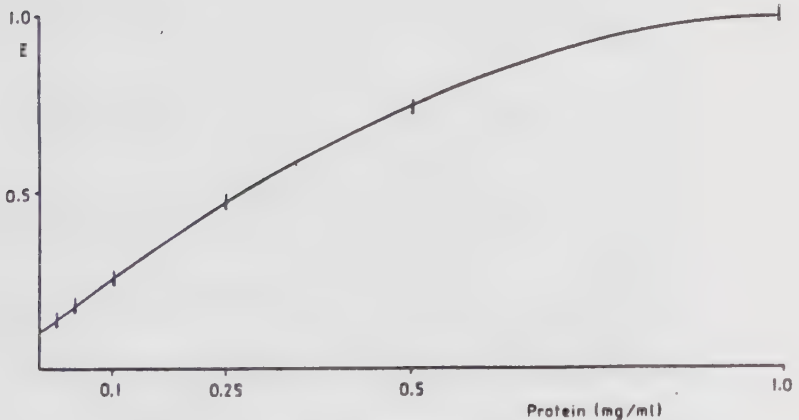


Abb.3: Standardkurve zur Proteinmessung

Abszisse: Rinderserumalbuminwerte (0,0 bis 1,0 mg/ml);
Ordinate: Extinktion bei 772 nm

2.2.6 Die Synthese von radioaktivem Fructose-1-Phosphat

Es ist zeitsparend zuerst eine große Säule mit DEAE - Cellulose - OH⁻ Form zu packen. Als Säule kann ein einfacher Trennungstrichter dienen, vor dessen Ablaufhahn etwas angefeuchtete Glaswolle liegen muß.

- Die Säule gründlich mit destillierten Wasser ausspülen
- ca. 50 ml DEAE - Cellulose - OH⁻ Form im Becherglas mit TRAP - Puffer 0,5 M waschen. Dazu das Glas mit Puffer auffüllen, mischen und warten, bis sich die Cellulose am Gefäßboden absetzt.
- Den Überstand entfernen und die Cellulose mit destillierten Wasser 2 - 3 x waschen(s.o.).
- Den letzten Überstand nicht entfernen; das Cellulose-Wassergemisch auf die Säule geben, wobei der Ablaufhahn geöffnet ist, so daß sich die Cellulose langsam absetzt, während das Wasser abtropft. Abhängig vom Durchmesser wird die Säule unterschiedlich hoch gepackt (bei 9 mm ϕ , ca. 15 cm hoch).
- Die gepackte Säule 2 x mit destillierten Wasser waschen; man muß darauf achten, daß die Oberfläche der Cellulose immer mit Flüssigkeit bedeckt ist, da sonst die Gefahr des Eintrocknens besteht.
- Falls nicht sofort benötigt, die gepackte Säule kühl lagern.

Zur Synthese von radioaktiver Fructose-1-phosphat wird folgender Ansatz verwendet:

250 μ Ci	C ¹⁴ - Fructose	30 ml
1 ml	TRAP - Puffer	pH 7,6 0,154 M
	(= Triäthanolaminphosphat-Puffer)	
50 μ l	MgCl ₂	; 30 μ l ATP
1 ml	Fructosekinasepräparation(letzte Fraktion)	

Das Gemisch wird für 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Danach wird die Reaktion für 10 Minuten bei 95° C abgestoppt. Die Lösung wird anschließend in Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert.

2.2.7 Trennung von radioaktiver Fruktose und radioaktivem Fruktose-1-Phosphat

Zur Trennung von radioaktiver Fruktose und radioaktivem Fruktose-1-phosphat gibt man das fertige Inkubationsgemisch auf die Säule. Der Ablaufhahn wird geöffnet und die Flüssigkeit tropft in nummerierte Reagenzgläser ab. Nach etwa 70 Tropfen stellt man ein neues Reagenzglas unter den Hahn, sodaß am Ende ca. 2 ml - Fraktionen gesammelt werden.

Die Säule wird nach dem Abtropfen des Ansatzes mit ca. 20 ml destilliertem Wasser gewaschen, danach mit ca. 10 ml TRAP - Puffer 0,1 M, pH 7,6 .

Je 50 µl der einzelnen Fraktionen werden in ein Vial gegeben und mit 6 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt. Anschließend wird die Radioaktivität im Counter für 1 Minute gezählt.

Auf Grund ihrer unterschiedlichen negativen Ladungen wird die radioaktive Fruktose schon durch das destillierte Wasser ausgewaschen, während die Fruktose-1-phosphat erst später mit dem TRAP - Puffer eluiert wird. Dies wird durch die cpm - Werte der einzelnen Fraktionen bestätigt. Nach dem ersten großen Gipfel, der die radioaktive Fruktose beinhaltet, findet sich ein zweiter, allerdings kleinerer Gipfel, der die radioaktive Fruktose-1-phosphat ausdrückt (Abb.4).

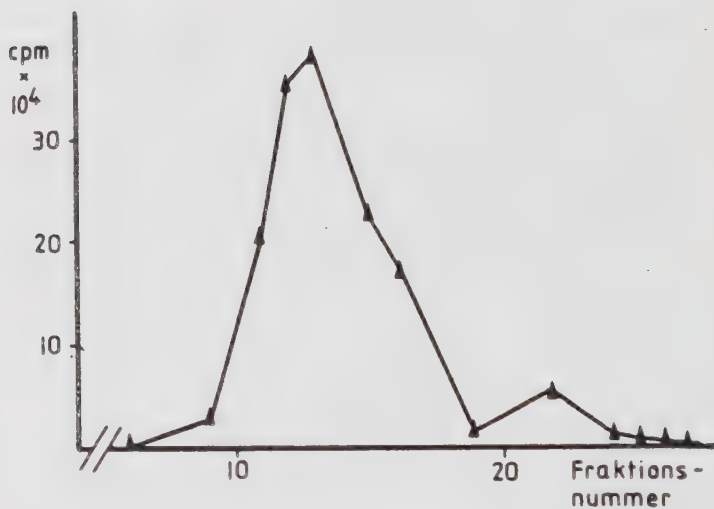


Abb.4: Elutionsdiagramm für C^{14} -Fructose und C^{14} -F1P

Säulendurchmesser: 9 mm

Cellulose-Füllhöhe: 15 cm

Zum Nachweis, daß die Fraktionen der zweiten Spitze radioaktive F1P enthalten, verwendeten wir die Methode von ROE et al.(41).

2.2.8 Nachweis von Fruktose-1-Phosphat modifiziert nach ROE et al. (41)

0,2 ml aqua bidest

10 µl F1P bzw. Probe

100 µl Farbentwickler: 10 mg Resorcin
25 mg Thioharnstoff
10 ml Essigsäure konz.

und 700 µl konzentrierte Salzsäure werden miteinander gemischt. Die Lösung wird für 10 Minuten im Wasserbad bzw. Inkubator von genau 80° C belassen; dann wird mit Leitungswasser gekühlt und 30 Minuten nach dem Beginn des Erhitzens bei 492 nm im Eppendorffphotometer die Extinktion gemessen.

Die F1P - Konzentrationen der Proben werden anhand einer Eichkurve aus bekannten F1P - Konzentrationen abgelesen.

Die Fraktionen der zweiten Spitze, die nachweislich radioaktive F1P enthalten, werden gesammelt und zur Aktivitätsmessung der F1P - Aldolase verwendet.

2.2.9 Aktivitätsmessung der F1P - Aldolase mit der radioaktiven Methode

2.2.9.1 Ansatz:

30 µl Gemisch: 3 Teile TRAP - Puffer
0,1 M; EDTA 9,4 mMol

1 Teil kalte F1P
(20 mM; 5 mM; 3 mM; 2mM)

1 Teil radioaktive C¹⁴ - F1P

Leerwerte:

Bei den Leerwerten wird statt Probenlösung Wasser verwendet oder aber Probenlösung, die 5 Minuten bei 95° C angeheizt, anschließend abgekühlt und zentrifugiert wurde.

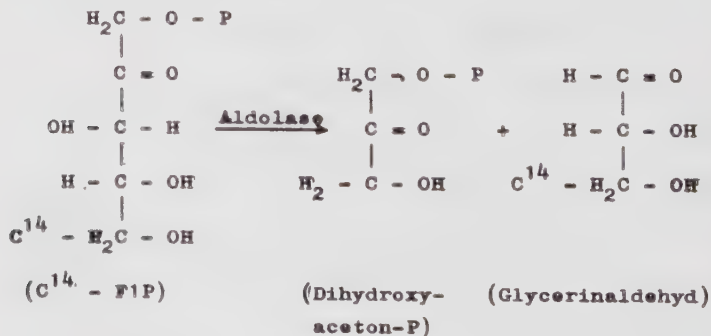
Vorgehen:

30 µl Probenlösung und je

30 µl radioaktives Gemisch

werden in ein Eppendorfhütchen pipettiert, kurz gerüttelt und exakt 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion im Heizblock bei 95° C für 5 Minuten gestoppt. Die Lösung kommt zur Abkühlung ins Eis und wird kurz zentrifugiert.

Die von uns hergestellte und hier im Ansatz verwendete C¹⁴-Fruktose-1-phosphat ist am sechsten Kohlenstoff radioaktiv markiert. Führt man sich die Molekülstrukturen und deren Reaktionsabläufe vor Augen, so wird deutlich, daß nach Spaltung der radioaktiven Fruktose-1-phosphat durch die Aldolase, radioaktiv markiertes Glycerinaldehyd entsteht, daß das Dihydroxyacetonphosphat aber kalt ist.



2.2.9.2 Die Ionenaustauschsäulenchromatographie zur
Trennung des radioaktiven Glycerinaldehyds
nach SHIN et al.(50)

Der Trennvorgang:

- Aus 2,5 ml - Einmalinjektionsspritzen wird der Stempel entfernt
- Der Kanülenkonus der Spritzen wird mit einer etwa 1 mm dicken Lage Glaswolle bedeckt
- Die Spritzen werden in eine Haltevorrichtung gehängt, die 50 Stück aufnehmen kann und ein Abtropfen direkt in Szintillationsvials ermöglicht(Abb.5)
- Ein Gemisch aus lauwarmer DEAE - Cellulose, Cl - Form und Wasser vorbereiten und die Säulen mit Pasteurpipetten bis zu einer Füllhöhe von 1 cm³ packen
- Die Säulen vorsichtig mit destilliertem Wasser auffüllen und abtropfen lassen
- Unter jede Säule neues Vial stellen
- Jeweils 50 ul des inkubierten Ansatzes auf die Säule geben
- Dreimal mit jeweils 1 ml destilliertem Wasser die Cellulose auswaschen
- Nach vollständigem Abfließen der Flüssigkeit pro Vial 18 ml Quickszint dazugeben und gut mischen
- Jedes Vial im Counter 1 Minute zählen lassen
- Unterdessen unter die Säulen neue Vials stellen und die restlichen Substanzen mit Salzsäure, HCl, 15 mM auswaschen; verwerfen

100% - Wert

Da von den insgesamt 60 µl Inkubationsgemisch nur 50 µl auf die Säulen gegeben werden, bleiben bei allen inkubierten Ansätzen 10 µl übrig. Diese Reste sammelt man, mischt sie und gibt 50 µl direkt ins Vial. Nach Zugabe von 18 ml Quickszint wird im Counter gezählt.

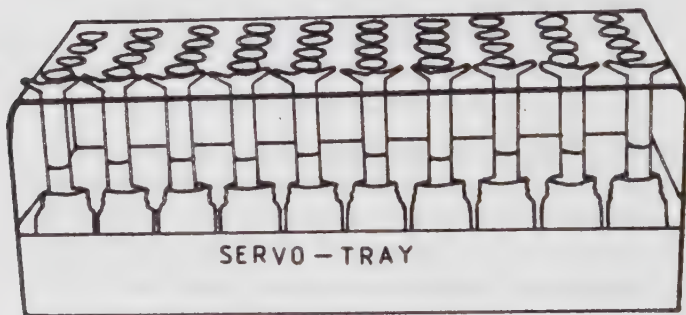


Abb. 5

HALTEVORRICHTUNG

FÜR MINI - DEAE - CELLULOSE - SÄULEN

Anordnung für 50 simultane Trennläufe; Servo-Tray für Szintillationsgefäße kommerziell erhältlich; die Striche auf den Spritzen geben die Füllhöhe der Cellulose an.

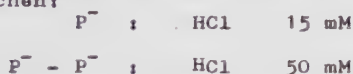
Prinzip der Säulenchromatographie



In der DEAE - Cellulose binden positiv geladene Stickstoffatome ^{14}C - F1P⁻ und DAP⁻. Gibt man Wasser auf die Säule, so wird das neutrale Glycerinaldehyd ausgewaschen. Prinzipiell ist das Verhältnis:

Cellulosevolumen : Wasser = 1 : 2 ausreichend, um das gesamte Glycerinaldehyd zu eluieren. Bei einem Cellulosevolumen von 1,5 ml würde man z.B. 2 x 2,5 ml Wasser verwenden; bei einem Volumen von 1 ml nähme man ca. 2 x 1,5 ml zum Auswaschen.

Um die Säulen später auch von F1P und DAP zu reinigen gibt man Salzsäure auf die Säule. Je größer die Anzahl der negativen Phosphatate im Molekül ist, desto höher muß die Molarität der Salzsäure sein, um die Substanz auszuwaschen:



2.2.9.3 Berechnung der Aldolasenaktivität

Die Aldolasenaktivität wird in nmol Glycerinaldehyd/min/mg Protein angegeben:

$$\frac{\text{cpm} - \text{Leerwert}}{100\% \text{ cpm}} \times \text{F1P} \times \frac{1}{I} \times \frac{1}{\text{Protein}}$$

cpm = counts per minute

100% cpm = Gesamtaktivität in cpm

F1P = Endkonzentration der Fruktose in nmol

I = Inkubationszeit in Minuten

Protein = mg Protein / ml der Probenlösung

Die Inkubationszeit sollte nicht länger als 1 Stunde betragen, da die cpm - Zahl nur in der Zeitspanne von 30 - 60 Minuten linear zunimmt.

2.2.10

Chemikalien:

- Aceton CH_3COCH_3 , Firma Merck, Darmstadt
- Adenosin-5'-Triphosphat $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_{13}\text{P}_3\text{Na}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Firma Merck, Darmstadt
- Äthylendiamintetraessigsäure $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{Na}_4\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
Firma Merck, Darmstadt
- Diethylaminoethyl-Cellulose, Firma Sigma Chemical
Company, München
- Essigsäure CH_3COOH , Firma Merck, Darmstadt
- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz, Firma Merck, Darm-
stadt
- Fruktose $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, Firma Merck, Darmstadt
- Fruktose radioaktiv D-(U- ^{14}C)-Fruktose, 250 μCi ,
Firma Amersham Buchler GmbH, Braunschweig
- Kaliumnatriumtartrat $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Firma Merck,
Darmstadt
- Kupfer(II)-sulfat CuSO_4 , Firma Merck, Darmstadt
- Magnesiumchlorid $\text{HgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Firma Merck, Darmstadt
- Natriumdihydrogencarbonat Na_2CO_3 , Firma Sigma Chemi-
cal Company, München
- di-Phosphorpentoxid P_2O_5 , Firma Merck, Darmstadt
- Quickszint 402, Firma Zinsser Analytic GmbH
- Resorcin $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$, Firma Merck, Darmstadt
- Thioharnstoff H_2NCSNH_2 , Firma Merck, Darmstadt
- Triethanolamin reinst $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_3$, Firma Merck, Darm-
stadt

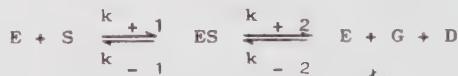
Geräte:

- Eppendorf-Photometer M1167671
- Präzisionsküvetten aus optischem Spezialglas
Firma Hellma, Typ-Nr. 105-OS, Schichttiefe 10,0 mm
- Sonifier B-10 Cell disrupter, Branson Sonic power
company, Danbury, Connecticut
- Eppendorf-Rotationsmischer - Nr. 3300
- Heizblock 37° C, 95° C
- Eppendorf-Zentrifuge
- Gefrierschrank Linde, Temperatur -20° C
- Pipetten
- Eppendorf-Gefäße
- Einmalküvetten
- große Säule $\varnothing$ 9 mm, 15 cm hoch
- Counter, Searle Analytic Inc., Delta 300,
6890 Liquid Scintillation System

2.3. Enzymkinetik

Die Theorie von MICHAELIS und MENTEN

Eine der ersten kinetischen Theorien der Enzymreaktionen stammt von MICHAELIS und MENTEN(59,60). Sie geht von der Annahme aus, daß je ein Molekül des Enzyms und des Substrates sich zu einer labilen Zwischenverbindung(Enzym-substratverbindung) vereinigt, die ihrerseits in die Endprodukte der Reaktion und das freie Enzym zerfällt. Bei der Zerlegung des Substrates Fruktose-1-phosphat(S) in D-Glyceraldehyd(G) und Dihydroxyacetonphosphat(D), unter dem Einfluß des Enzyms Aldolase(E), würden also die folgenden Reaktionen ablaufen:



Der wichtigste Faktor mit Einfluß auf die Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion ist die Konzentration der Reaktionsteilnehmer.

Enzymkonzentration:

Die Anfangsgeschwindigkeit V einer enzymkatalysierten Reaktion ist bei Substratüberschuß direkt proportional der Enzymkonzentration. Die Anfangsgeschwindigkeit wird zu einem Zeitpunkt gemessen, an dem erst sehr wenig Substrat umgesetzt worden ist.

Substratkonzentration:

Wenn die Konzentration eines Substrates erhöht wird, während alle anderen Bedingungen konstant bleiben, erreicht die Anfangsgeschwindigkeit der Enzymreaktion V den Maximalwert $V_{\max}$, der durch weitere Substratzugabe nicht mehr überschritten werden kann. Die Geschwindigkeit wächst bis zu einem Punkt, an dem alle Enzymmoleküle mit Substrat gesättigt sind.

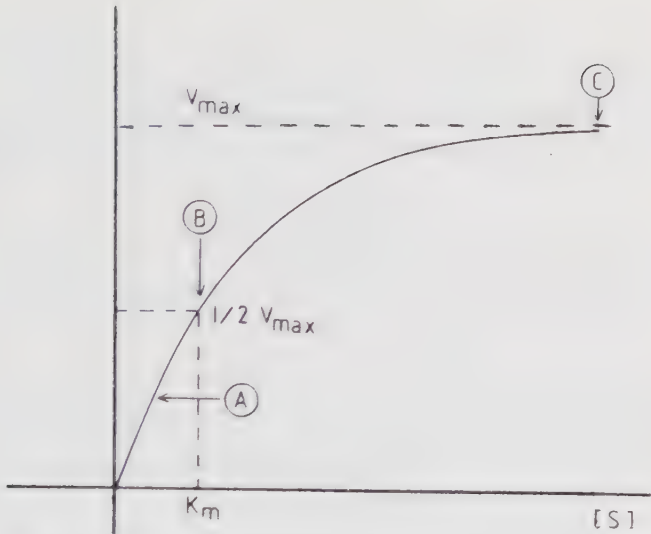


Abb.6: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms von der Substratkonzentration

Dieses Verhalten ist graphisch in Abb.6 dargestellt:

In Situation A oder B wird eine Erhöhung oder eine Verringerung von Substrat dazu führen, daß mehr oder weniger Substrat an das Enzym gebunden wird. V ist abhängig von der Konzentration des Substrates.

In Situation C sind im wesentlichen alle Enzymmoleküle mit Substrat abgesättigt, sodaß eine weitere Erhöhung des Substrates die Geschwindigkeit der Reaktion nicht weiter steigern kann.

B beschreibt die Situation, in der genau die Hälfte der Enzymmoleküle Substrat gebunden hat. Die Geschwindigkeit ist daher $1/2$ der Maximalgeschwindigkeit $V_{\max}$, die mit der vorhandenen Enzymkonzentration erreicht werden kann.

Geht man von unserem Fall einer enzymatischen Reaktion aus und berücksichtigt die Voraussetzung von MICHAELIS und MENTEN, daß die Umwandlung von ES zu E + G + D den

geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt, dann ist die Geschwindigkeit der enzymatischen Katalyse proportional der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes:

$$V = k_{+2} [ES]$$

Setzt man für die Gesamtmenge an Enzym den Ausdruck E_t , so ergibt sich für die Maximalgeschwindigkeit der Enzymkatalyse:

$$V_{\max} = k_{+2} [E_t]$$

Die Menge an freiem Enzym = ($[E_t] - [ES]$)

Die Bildungsgeschwindigkeit von ES aus E und S läßt sich also ausdrücken als

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1} [E_t] - [ES] [S]$$

Die Rückreaktion $E + G + D$ zu ES ist vernachlässigbar klein und bleibt daher unberücksichtigt.

Die Geschwindigkeit des Zerfalls von ES ist die Summe zweier Reaktionen:

$$\frac{-d[ES]}{dt} = k_{-1} [ES] + k_{+2} [ES]$$

Im Fließgleichgewicht (steady state) sind die Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeiten von ES gleich groß:

$$k_{+1} [E_t] - [ES] [S] = k_{-1} [ES] + k_{+2} [ES]$$

oder

$$\frac{[E_t] - [ES]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1} [S]} = K_m$$

Für den Gesamtausdruck der Einzelkonstanten wird nun eine Konstante, die "Michaelis-Menten-Konstante" K_m verwendet.

Nach $[ES]$ aufgelöst ergibt sich:

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]}$$

Wenn $V = k_2 [ES]$ ist, dann ist

$$V = k_2 \frac{[E_t][S]}{K_m + [S]}$$

oder

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Dieser Ausdruck ist die Michaelis-Menten-Gleichung, die das Aktivitätsverhalten vieler Enzyme in Abhängigkeit von der Substratkonzentration beschreibt.

Wenn $S = K_m$ (Situation B in Abb.6) dann ist

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{\max} [S]}{[S] + [S]} = \frac{V_{\max} [S]}{2 [S]} = \frac{V_{\max}}{2}$$

Dies bedeutet, daß der K_m - Wert diejenige Substratkonzentration angibt, bei der die gemessene Geschwindigkeit V gleich der Hälfte der Maximalgeschwindigkeit $V_{\max}$ ist. Die Michaelis-Konstante K_m hat die Dimension mol/l.

Die Michaelis-Menten-Gleichung kann algebraisch in andere, bei der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse leichter anwendbare Formen umgewandelt werden. Eine weitverbreitete Umformung ist die reziproke Form der Michaelis-Menten-Gleichung:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]}$$

Durch weitere Umformung erhalten wir

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Die sog. Lineweaver-Burk-Gleichung.

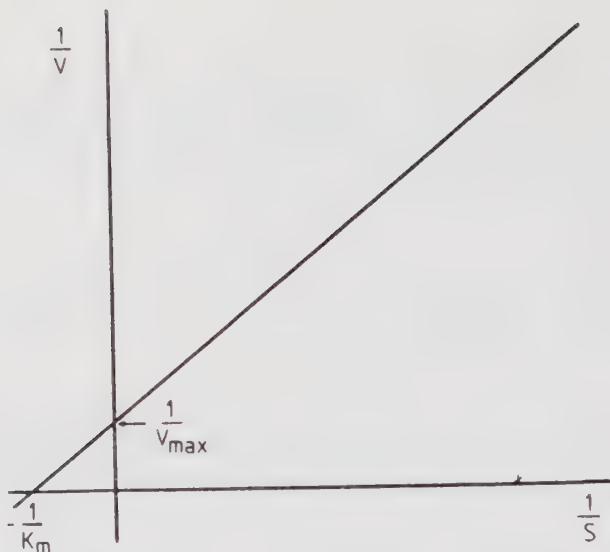


Abb.7: Lineweaver-Burk-Diagramm
Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms von der Substratkonzentration in doppelt-reziproker Auftragung

Die Lineweaver-Burk-Gleichung stellt eine Gerade dar mit der Steigung $K_m/V_{\max}$ und einem Abschnitt auf der $1/V$ -Achse von $1/V_{\max}$ (Abb.7). Diese Gerade erhält man, wenn man $1/V$ gegen $1/[S]$ aufträgt. Diese doppelt reziproke Darstellung hat den Vorteil, daß man $V_{\max}$ genauer ermitteln kann als in der einfachen Darstellung V gegen $[S]$; dort wird der Wert für $V_{\max}$ asymptotisch erreicht, und er ist deshalb ungenau. Der Abschnitt auf der Abszisse der Lineweaver-Burk-Darstellung ist gleich $-1/K_m$. Auf diese Weise läßt sich der K_m - Wert graphisch ermitteln.

3. ERGEBNISSE

3.1 Proteingehalt der Fibroblasten in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Tabelle 3 gibt eine Zusammenfassung der Proteinwerte wieder mit den Mittelwerten für die einzelnen Kulturnummern, den dazugehörigen Standardabweichungen und Wertebereichen. Der Eiweißgehalt ist in mg angegeben und jeweils auf die zwei Zellkulturflaschen bezogen, die zum gleichen Zeitpunkt nach einer bestimmten Kultivierungsdauer aus dem Inkubator genommen wurden und deren Zellinhalt in insgesamt 400 µl physiologische Kochsalzlösung eingefroren wurde.

Bis zu einer Inkubationsdauer von 7 Tagen erhöht sich ständig der Proteingehalt in den angesetzten Zellkulturen von 0,765 mg nach einer Kultivierungsdauer von 2 Tagen auf einen Gehalt von 1,514 mg Protein. Von diesem Zeitraum ab beginnt der Proteingehalt zu sinken, mit der Folge, daß am 9. Inkubationstag ein um etwa 40% niedrigerer Wert gemessen wird, nämlich 0,975 mg Protein. Diese abfallende Tendenz hält jedoch nicht lange an, sodaß nach 12 Tagen bereits wieder ein Mittelwert von 1,098 mg gemessen wird, um am 15. Inkubationstag schließlich auf 1,209 mg Protein zu steigen.

Abb.8 veranschaulicht den Sachverhalt nochmals, wobei das Gesamtprotein im Endgemisch gegen die Inkubationstage aufgetragen wird. Die Mittelwerte sind als Punkte dargestellt mit ihren Standardabweichungen, deren Bereich durch senkrechte Linien gekennzeichnet ist. Der Kurvenverlauf ist durch zwei Phasen bestimmt:

In der ersten Phase wird ein exponentieller Anstieg auf den zweifachen Wert des Initialgehaltes innerhalb von 5 Tagen beobachtet, dem nach einem kurzfristigen, wahrscheinlich kulturbedingtem Abfall des Eiweißgehalts in der zweiten Phase eine lineare Zunahme während der letzten 6 Tage folgt.

3.2 Versuchsdurchgang 1

Tabelle 4 faßt die Ergebnisse des 1. Versuchsdurchgangs zusammen und gibt die Aktivität der Aldolase gegenüber F1P in den Fibroblastenkulturen, in Abhängigkeit von Inkubationsdauer, Substratangebot und Proteinmenge wieder.

Trotz des geringen Proteingehalts in der Probenlösung, ist die Aktivität der Aldolase bis auf drei Ausnahmen während des beobachteten Zeitraums regelmäßig nachweisbar. Zwar läßt sich nicht in allen Werten eine kontinuierliche Steigerung mit der Länge der Kultivierungsdauer der Fibroblasten erkennen, doch geht die Entwicklung zu erhöhten Umsatzraten hin, je länger sich die Zellen im Inkubator differenzieren konnten. Eine Steigerung der Enzymaktivität läßt sich zum Beispiel bei einem Substratangebot von 0,2 mM F1P erkennen, wenn man die Kulturnummern II, VI und VII vergleicht. Von 0,06 nmol/min/mg Protein nach 2 Inkubationstagen steigt die Aldolasenaktivität auf 0,09 nmol/min/mg Protein nach 12 Tagen und schließlich auf 0,18 nmol/min/mg Protein nach 15 Inkubationstagen.

Abb.9 zeigt die graphische Darstellung der ersten Versuchsergebnisse im Lineweaver-Burk-Diagramm.

Trägt man $1/V$ und $1/S$ gegeneinander auf, so stehen die Punkte der Kulturnummer II nicht in linearer Beziehung zueinander, während sich durch die Punkte, die sich an Hand der Ergebnisse der Kulturen IV, V und VII ergeben, eine Gerade legen läßt. Diese Tatsache steht im Einklang mit einer früheren Studie unseres Labors (49), in der die F1P-Aldolasenaktivität im Lebergewebe von Gesunden und HFI-Patienten untersucht wurde. Bei der Darstellung im Lineweaver-Burk-Diagramm ergab sich für die HFI-Patienten eine Kurve, ähnlich der von Kultur II, während die Werte

der gesunden Personen auf Geraden lagen, wie bei Kultur IV, V und VII.

Auch was die graphisch ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten betrifft, lassen sich Veränderungen erkennen, die auf einen Strukturwandel in den Zellen hinweisen und die sich in einem quantitativen Absinken der Konstante mit der Länge der Kultivierungszeit manifestieren. So ergibt sich für die Kulturnummer IV ein K_m - Wert von 3,7 mM, für die Kultur V ein K_m - Wert von 2,3 mM und für die Kulturnummer VII ein K_m - Wert von 1,4 mM.

3.3 Versuchsdurchgang 2

Tabelle 5 gibt die FIP - Aldolasenaktivität in den kultivierten Fibroblasten des 2. Versuchsdurchgangs wieder.

Zwar ist es nicht möglich, von einer kontinuierlichen Erhöhung der Aldolasenaktivität gegenüber FIP beim Vergleich der einzelnen Kulturnummern zu sprechen, doch kann man auch hier, parallel zu den Beobachtungen im 1. Versuchsdurchgang, eine steigende Tendenz der Umsatzrate mit der Inkubationsdauer erkennen. Vergleicht man beispielsweise die gemessenen Werte der Probenlösung aus Kulturnummer I mit denen aus Kulturnummer VII so zeigen sie ein Verhalten, das typisch wäre für eine höhere Konzentration an Aldolase B mit steigendem Differenzierungsgrad der Zellen. Bei einer Substratkonzentration von 2 mM FIP beträgt die FIP-spezifische Aldolasenaktivität der Kultur I 2,1 nmol/min/mg Protein, die der Kultur VII 2,24 nmol/min/mg Protein; bei 0,5 mM FIP in der Probenlösung beläuft sich die Aktivität nach 2 Inkubationstagen auf 0,24 nmol/min/mg Protein, nach 15 Tagen auf 0,58 nmol/min/mg Protein; bei einer Konzentration von 0,3 mM FIP beträgt sie für Kultur I 0,16 nmol/min/mg Protein und für Kultur VII 0,4 nmol/min/mg Protein;

bei einer Substratmenge von 0,2 mM FIP steigt die Aldolasenaktivität innerhalb von 13 Inkubationstagen von 0,1 auf 0,18 nmol/min/mg Protein.

Abb. 10 ist die graphische Darstellung der Ergebnisse des 2. Versuchsdurchgangs im Lineweaver-Burk-Diagramm. Auch hier zeigt sich ein Verhalten, das kennzeichnend ist für eine steigende Aldolasenaktivität gegenüber FIP mit der Dauer der Inkubationszeit. Die Graphen der ersten drei Kulturnummern sind nicht-lineare, hyperbole Kurven, die auch typisch sind für die FIP - Aldolase im Lebergewebe von HFI - Patienten. Stellt man die Werte dar, die mit Probenlösung aus Kulturnummer VI erzielt wurden, so liegen diese auf einer Geraden, was auf einen erhöhten Gehalt an Aldolase B schließen läßt. Bestimmt man die Michaelis-Menten-Konstante für Kultur VI so ergibt sich ein Wert von 2,0 mmol/l. Würde man den unteren, nahezu linearen Anteil der Graphen der Kulturnummern II und III verlängern, so würden sie die x - Achse früher schneiden als die Gerade der Kulturnummer VI und die Michaelis-Menten-Konstanten wären somit höher.

3.4 Versuchsdurchgang 3

Tabelle 6 schlüsselt die Ergebnisse des 3. Versuchsdurchgangs auf und gibt die FIP - spezifische Aldolasenaktivität in Abhängigkeit von Eiweißgehalt und Inkubationsdauer wieder.

Bei der Proteinbestimmung fällt auf, daß der Proteingehalt der Zellkulturen in den ersten 5 Tagen der Inkubation um fast 100% des Initialwertes ansteigt. Vergleicht man im 3. Versuchsdurchgang die Umsatzraten der Aldolase in Kultur I und VII, so kann man bei allen Mengen an angebotenem Substrat nach 15 Inkubationstagen

eine eindeutig höhere Aktivität gegenüber FIP feststellen als nach 2 Inkubationstagen. Beim Angebot von 2 mM FIP steigert sich das Ausmaß der Umwandlung von FIP in Glycerinaldehyd innerhalb von 13 Tagen im Inkubator um mehr als den Faktor 2, nämlich von 0,5 auf 1,12 nmol/min/mg Protein; bei 0,5 mM FIP von 0,26 auf 0,34 nmol/min/mg Protein; bei 0,3 mM FIP von 0,17 auf 0,22 nmol/min/mg Protein und bei 0,2 mM FIP von 0,13 auf 0,16 nmol/min/mg Protein.

Abb. 11 veranschaulicht die Werte des 3. Versuchsdurchgangs in einem Lineweaver-Burk-Diagramm.

Die Schnittpunkte der Graphen mit der Abszisse wandern für die höheren Kulturnummern in immer negativere Bereiche, was zur Folge hat, daß die Michaelis-Menten-Konstante mit der Länge der Kultivierungsdauer niedrigere Werte annimmt. Daraus ergibt sich für die Kultur II noch ein K_m - Wert von über 10 mmol/l, für Kultur IV ein K_m - Wert von 4,5 mmol/l und schließlich für die Kulturen V bis VII ein K_m - Wert von 1,7 mmol/l.

Ebenso fällt eine große Übereinstimmung bezüglich aller Werte der Kulturnummern IV, V, VI und VII auf, wobei dem nicht-linearen Verlauf des Graphen für die Umsatzraten der Kulturnummer II die Geraden gegenüberstehen, auf denen die Punkte der Kulturnummern IV, V, VI und VII liegen.

3.5 Versuchsdurchgang 4

Die Resultate des 4. Versuchsdurchgangs sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Auch diese Ergebnisse stehen im Einklang mit unserer Vermutung, daß das Ausmaß der Umwandlung von FIP in Glycerinaldehyd zu Beginn der Inkubationszeit niedriger

ist als nach einer Kultivierungszeit von 15 Tagen. Berücksichtigt man den gesamten Beobachtungszeitraum, so ist eine steigende Tendenz der Affinität der Aldolase gegenüber F1P nicht zu leugnen. Bei einem Vergleich der Werte der Kulturen I und VII wird bei einem Substratangebot von 0,2 mM F1P eine bis zu 4-fache Steigerung deutlich, nämlich von 0,04 nmol/min/mg Protein auf 0,165 nmol/min/mg Protein. Bei einem Gehalt von 0,3 mM F1P steigt die Aldolasenaktivität von 0,08 auf 0,206 nmol/min/mg Protein und bei einem Zusatz von 2 mM F1P von 0,5 auf 0,79 nmol/min/mg Protein. Diese Aktivitätssteigerung der Aldolase, die in allen Versuchsdurchgängen zwischen Kultur I und VII deutlich wird, kann man im 4. Versuchsdurchgang ab dem 5. Inkubationstag von Kultur zu Kultur verfolgen. Bei einem Substratgehalt von 2 mM F1P beträgt die Umsatzrate nach 5 Inkubationstagen 0,36 nmol/min/mg Protein, nach 7 Tagen 0,44 nmol/min/mg Protein, nach 9 Tagen 0,61 nmol/min/mg Protein, nach 12 Tagen 0,67 nmol/min/mg Protein und schließlich nach 15 Tagen 0,79 nmol/min/mg Protein.

Abb. 12 und 13 verdeutlichen die kinetischen Parameter des 4. Versuchsdurchgangs im Lineweaver-Burk-Diagramm. Im Gegensatz zu den Abbildungen 9 - 11 liegen die Punkte der Kultur III auf einer Geraden, wenn man die Kehrwerte von Umsatzgeschwindigkeit und angebotener Substratmenge im Endgemisch gegeneinander aufträgt. Völlige Übereinstimmung mit den Resultaten der übrigen Versuchsdurchgänge besteht jedoch hinsichtlich des Verhaltens der Michaelis-Menten-Konstante. Mit der Höhe der Kulturnummern sinkt diejenige Substratkonzentration, bei der die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit V gleich der Hälfte der Maximalgeschwindigkeit $V_{\max}$ ist. Für die Kulturnummer IV ergibt sich mittels graphischer

Bestimmung für die Michaelis-Menten-Konstante ein Wert von 4,5 mmol/l, für die Kultur V ein K_m - Wert von 2,5 mmol/l, für die Kultur VI ein Wert von 1,8 mmol/l und für die Kultur VII ein Wert von 1,43 mmol/l.

3.6 Versuchsdurchgang 5

Tabelle 8 faßt die Ergebnisse des 5. Versuchsdurchgangs mit der Aldolasenaktivität und dem Proteingehalt der Fibroblastenkulturen I bis VII zusammen.

Die Proteinwerte stiegen konstant während der ersten 7 Inkubationstage an, zeigten dann eine leichte Tendenz abzufallen, um vom 9. bis zum 12. Tag wieder zu steigen.

Vergleicht man die Aktivitätswerte im 5. Versuchsdurchgang, so ist eine gewisse Steigerung mit zunehmender Kultivierungsdauer erkennbar, auch wenn eine regelmäßige Erhöhung der Umsatzrate nicht in allen Werten und Beobachtungsintervallen nachzuweisen ist. Wenn wir uns die Umsatzraten von FIP in anderen Organen ins Gedächtnis zurückrufen, so ergibt sich nach SHIN et al. (48) in adulter Leber bei Substratsättigung mit der spectrophotometrischen Methode in Isoenzym B reichem Lebergewebe eine durchschnittliche Aldolasenaktivität von 1,7 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ Gewebe mit einer Standardabweichung von 0,89 und einem Wertebereich von 0,46 - 3,8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ Gewebe.

In Abb. 14 wird das Verhalten der Werte von Kultur III, VI und VII im Lineweaver-Burk-Diagramm kinetisch analysiert. Die hohen Aktivitätswerte der Kulturen VI und VII sind mit niedrigen Werten der Michaelis-Menten-Konstante verbunden. Für die Kulturnummer VII ergibt sich ein K_m - Wert von 1,5 mmol/l, für die Kultur VI ein Wert von 1,9 mmol/l. Aus der geringeren Affinität

der Aldolase gegenüber F1P in Kultur III resultiert ein 4-facher Anstieg der Michaelis-Menten-Konstante auf 7,5 mmol/l.

3.7 Versuchsdurchgang 6

Tabelle 9 gibt die Ergebnisse des 6. Versuchsdurchgangs wieder, insbesondere den Aldolasenspiegel der einzelnen Kulturen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer.

Wenn man den Aktivitätswerten von Kultur I, die von Kultur VII gegenüberstellt, so fällt eine Steigerung für alle Substratmengen auf. Der Unterschied in der Inkubationsdauer von 13 Tagen spiegelt sich in einer bis zu 2-fachen Steigerung der Umsatzraten wieder. Während die Aldolase bei einem Zusatz von 0,5 mM F1P zum Gemisch nach 2 Kultivierungstagen 0,16 nmol Glycerinaldehyd/min/mg Protein umsetzt, sind es nach 15 Tagen 0,39 nmol/min/mg Protein. Bei 2 mM F1P steigert sich die Aldolasenaktivität von 1,05 nmol/min/mg Protein auf 1,35 nmol/min/mg Protein, bei 0,3 mM F1P von 0,19 auf 0,25 nmol/min/mg Protein und bei 0,2 mM F1P von 0,118 auf 0,12 nmol/min/mg Protein.

Betrachtet man die einzelnen Kulturnummern so kann man eine regelmäßige Steigerung der Umsatzraten bei einem Substratangebot von 0,5 mM F1P beobachten. Nach 2 Inkubationstagen beträgt die Aldolasenaktivität 0,16 nmol/min/mg Protein, nach 3 Tagen 0,2 nmol/min/mg Protein, nach 7 Tagen 0,21 nmol/min/mg Protein, nach 9 Tagen 0,29 nmol/min/mg Protein, nach 12 Tagen 0,3 nmol/min/mg Protein und nach 15 Tagen 0,39 nmol/min/mg Protein.

Abb.15 gibt die charakteristischen kinetischen Unterschiede zwischen den kurzzeitig und den längerfristig inkubierten Kulturen des 6. Versuchsdurchgangs wieder.

Die Michaelis-Menten-Konstante für die Kulturnummer II

liegt bei einem Wert von über 10 mmol/l; für die Kultur IV liegt sie etwa bei 6 mmol/l; für die Kultur V beträgt sie 5 mmol/l und für die Kulturnummer VII ergibt sich eine Michaelis-Menten-Konstante von 1,7 mmol/l. Diese Ergebnisse erfüllen unsere Erwartungen insofern, als das Fallen der Michaelis-Menten-Konstante eine steigende Affinität der Aldolase gegenüber F1P mit zunehmender Kultivierungsdauer widerspiegelt.

3.8 Zusammenfassung der wichtigsten Versuchsergebnisse

Tabelle 10 stellt eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse der insgesamt 6 Versuchsdurchgänge dar. Sie gibt die in den Lineweaver-Burk-Diagrammen ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten wieder, sowie die Mittelwerte der F1P - Aktivität der Aldolase bei einem Zusatz von 0,5 mM F1P zum Gemisch mit Standardabweichung und Wertebereichen für die einzelnen Kulturnummern.

Bei der Substratkonzentration von 0,5 mM F1P im Endgemisch ist die Verschiebung des Isoenzymusters mit steigendem Differenzierungsgrad der Fibroblasten besonders deutlich. Die gemittelten Werte der Aldolasenaktivität erhöhen sich stetig von Kultur I bis VII, d.h. von 0,22 nmol/min/mg Protein nach 2 Inkubationstagen auf eine Enzymaktivität von 0,42 nmol/min/mg Protein nach 15 Inkubationstagen, was eine Steigerung um fast 100% bedeutet. Interessant sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von SHIN et al.(51), die bei der Aktivitätsmessung der Aldolase gegenüber F1P in verschiedenen Organen mit der spectrophotometrischen Methode erzielt wurden. So ergab sich in dem an Aldolase C reichem Hirngewebe eine F1P - spezifische Aktivität von durchschnittlich 0,24 μ mol/min/g Gewebe. In Biopsien von adulter Leber, dem an Aldolase reichstem Organ im menschlichen Körper,

liegt die mittlere FIP - Aldolasenaktivität bei 1,7 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ Gewebe. Obwohl diese Werte nicht direkt vergleichbar sind mit unseren Messungen in Fibroblasten, so geben sie doch einen Hinweis auf die Genauigkeit der in unserem Labor entwickelten radioaktiven Methode(49), die es uns ermöglichte auch in niedrigeren Meßbereichen gut reproduzierbare Werte mit geringen Standardabweichungen zu erzielen.

Neben den Aktivitätswerten der Aldolase gibt die Tabelle 10 auch die gemittelten Michaelis-Menten-Konstanten wieder, die in den 6 Versuchsdurchgängen graphisch bestimmt wurden. Die Steigerung der Umsatzraten während der Inkubationszeit ist mit einem Absinken der K_m - Werte verbunden. Vergleicht man den Wert von über 10 mmol/l der ersten 3 Kulturen mit der Michaelis-Menten-Konstante von 1,43 der Kultur VII, so wird deutlich, daß diejenige Substratmenge auf 1/10 des Initialwertes absinkt, bei der die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit V gleich der Hälfte der Maximalgeschwindigkeit V_{max} ist. Die Affinität der Aldolase gegenüber FIP steigt. Um den Bezug von den Fibroblasten zu anderen Organen herzustellen, sollte die Michaelis-Menten-Konstante von adulter Leber erwähnt werden, die nach SHIN et al.(48) 1,0 - 2,0 mmol/l beträgt, ein Wert, der in unseren Versuchen nach einer Inkubationsdauer von 15 Tagen erreicht wird.

Auch im Verhalten der Graphen im Lineweaver-Burk-Diagramm schlägt sich die Dauer der Inkubation nieder. Für die kurzfristig kultivierten Zellen ergeben sich hyperbole Kurven, was auf unreife Isoenzymformen mit geringer Affinität hinweist und bedeutet, daß bei Erhöhung der Substratkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit überproportional ansteigt. Im Gegensatz dazu liegen die Werte der Kulturen IV, V, VI und VII auf

Geraden, da diese reicher an Aldolase B sind, so daß sich auch kleine FIP - Mengen nahezu vollständig an das Enzym binden und die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Substratkonzentration linear steigt.

Auf die Bedeutung unserer Ergebnisse vor allem im Zusammenhang mit den Resultaten anderer Autoren und im Hinblick auf die Zielsetzung dieser Arbeit wird in der Diskussion eingegangen.

Tab.3: Gesamtprotein im Fibroblastenhomogenat

Kultur Nr.	^x Inkubations-tage	n	Proteingehalt(mg) Mittelwert $\pm$ SD	Wertebereich
I	2	6	0,765 $\pm$ 0,239	0,48 - 1,09
II	3	6	0,781 $\pm$ 0,168	0,6 - 1,09
III	5	6	1,09 $\pm$ 0,186	0,48 - 1,43
IV	7	6	1,514 $\pm$ 0,322	1,16 - 2,1
V	9	6	0,975 $\pm$ 0,171	0,83 - 1,34
VI	12	6	1,098 $\pm$ 0,389	0,69 - 1,7
VII	15	6	1,209 $\pm$ 0,5	0,58 - 2,02

^xAnzahl der Tage im Inkubator nach der letzten Abtrypsinierung

n ist die Anzahl der untersuchten Proben

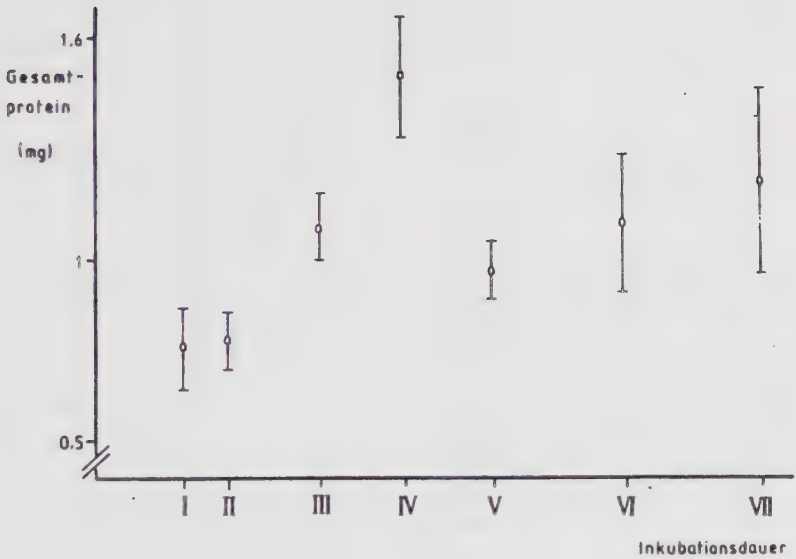


Abb.8: Gesamtprotein in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Die Proteinwerte sind auf 400 μ l Fibroblastenhomogenat bezogen. I bis VII kennzeichnen den Zeitpunkt, an dem die einzelnen Kulturen dem Inkubator entnommen wurden.

 : Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

Tab.4: Aktivität der Aldolase gegenüber F1P

im 1. Versuchsdurchgang

Kultur Nr.	Protein mg/ml	^x Enzymaktivität nmol/min/mg Protein	Substrat mmol/l	^{xx} Inkubations-tage
I	0,125	0 1,12 0,55 0,06	2 0,5 0,3 0,2	2
II	0,09	1,8 0,94 0,18 0,06	2 0,5 0,3 0,2	3
III	0,1	0 0,62 0,28 0,06	2 0,5 0,3 0,2	5
IV	0,14	1,23 0,58 0,38 0,08	2 0,5 0,3 0,2	7
V	0,1	2,0 0,53 0,42 0,27	2 0,5 0,3 0,2	9
VI	0,1	0 0,46 0,3 0,09	2 0,5 0,3 0,2	12
VII	0,19	2,0 0,4 0,22 0,18	2 0,5 0,3 0,2	15

^xEnzymaktivität bei 2 mM, 0,5 mM, 0,3 mM bzw. 0,2 mM
Fructose-1-Phosphat im Endgemisch

^{xx}Anzahl der Tage, welche die Zellen nach dem letzten
Abtrypsinierungsvorgang im Inkubator verblieben

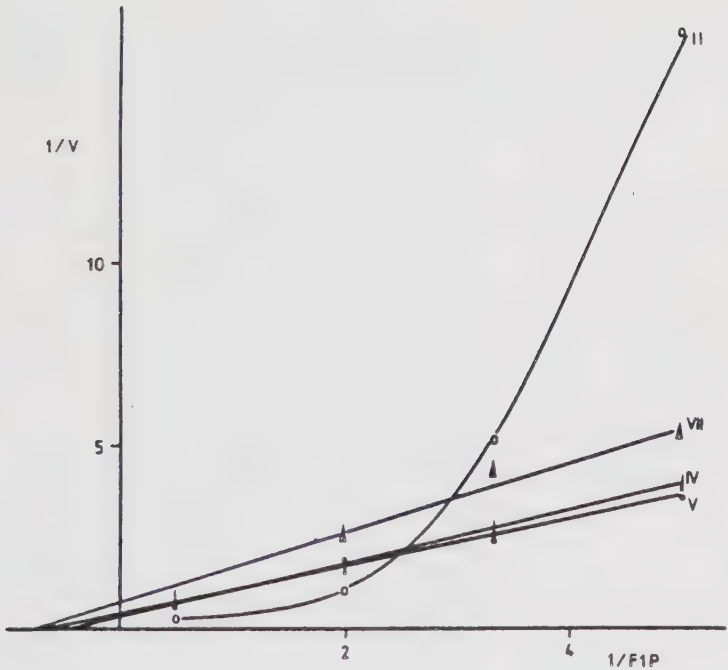


Abb.9: Lineweaver-Burk-Diagramm des 1. Versuchsdurchganges.

Doppelt reziproke Darstellung von Substrat-
konzentration (mmol) und Reaktionsgeschwindig-
keit (nmol/min/mg Protein).

(O): Graph der Kultur II; Inkubationsdauer 3 Tage

(▲): Graph der Kultur IV; Inkubationsdauer 7 Tage

(o): Graph der Kultur V; Inkubationsdauer 9 Tage

(▲): Graph der Kultur VII; Inkubationsdauer 15 Tage

Tab.5: Aktivität der Aldolase gegenüber F1P

im 2. Versuchsdurchgang

Kultur Nr.	Protein mg/ml	Enzymaktivität nmol/min/mg Protein	Substrat mmol/l	Inkubations-tage
I	0,13	2,1 0,24 0,16 0,1	2 0,5 0,3 0,2	2
II	0,13	1,9 0,34 0,22 0,14	2 0,5 0,3 0,2	3
III	0,17	1,36 0,40 0,26 0,17	2 0,5 0,3 0,2	5
IV	0,25	1,38 0,22 0,18 0,10	2 0,5 0,3 0,2	7
V	0,16	1,11 0,34 0,26 0,18	2 0,5 0,3 0,2	9
VI	0,115	2,12 0 0,34 0,24	2 0,5 0,3 0,2	12
VII	0,24	2,24 0,58 0,40 0,18	2 0,5 0,3 0,2	15

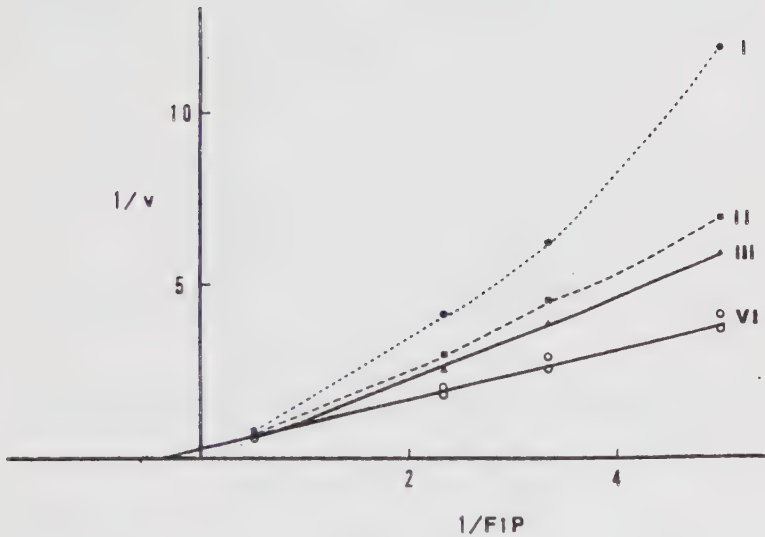


Abb.10: Lineweaver-Burk-Diagramm des 2. Versuchsdurchgangs

Abszisse: Kehrwert der Substratkonzentration (mmol/l);
Ordinate: Kehrwert der Reaktionsgeschwindigkeit
(nmol/min/mg Protein);

- (•) : Graph der Kultur I ; Inkubationsdauer 2 Tage
- (-) : Graph der Kultur II ; Inkubationsdauer 3 Tage
- (▲) : Graph der Kultur III; Inkubationsdauer 5 Tage
- (○) : Graph der Kultur VI ; Inkubationsdauer 7 Tage

Tab.6: Aktivität der Aldolase gegenüber F1P
im 3. Versuchsdurchgang

Kultur Nr.	Protein mg/ml	Enzymaktivität nmol/min/mg Protein	Substrat mmol/l	Inkubations- tage
I	0,24	0,5 0,26 0,17 0,13	2 0,5 0,3 0,2	2
II	0,3	0,96 0,24 0,144 0,05	2 0,5 0,3 0,2	3
III	0,5	0,8 0,19 0,22 0,08	2 0,5 0,3 0,2	5
IV	0,58	1,18 0,3 0,182 0,12	2 0,5 0,3 0,2	7
V	0,455	1,3 0,36 0,25 0,15	2 0,5 0,3 0,2	9
VI	0,39	1,12 0,3 0,196 0,122	2 0,5 0,3 0,2	12
VII	0,29	1,12 0,34 0,216 0,16	2 0,5 0,3 0,2	15

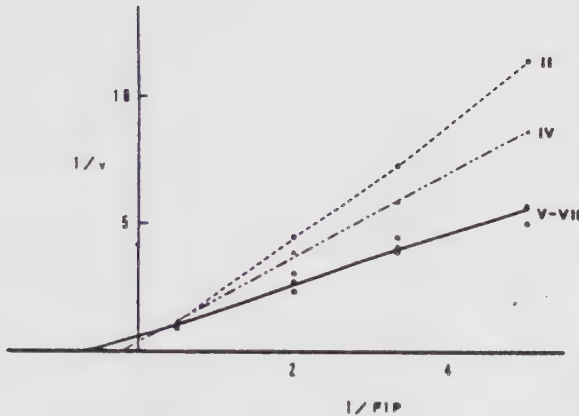


Abb.11; Lineweaver-Burk-Diagramm des 3. Versuchsdurchgangs

Abszisse: Kehrwert der Substratkonzentration (mmol/l);

Ordinate: Kehrwert der Reaktionsgeschwindigkeit
(nmol/min/mg Protein)

(■) : Graph der Kultur II; Inkubationsdauer 3 Tage

(▲) : Graph der Kultur IV; Inkubationsdauer 7 Tage

(o) : Graphen der Kulturen V - VII; Inkubations-
dauer 9 - 15 Tage

Tab.7: Aktivität der Aldolase gegenüber F1P
im 4. Versuchsdurchgang

Kultur Nr.	Protein mg/ml	Enzymaktivität nmol/min/mg Protein	Substrat mmol/l	Inkubations- tage
I	0,33	0,5 0 0,08 0,04	2 0,5 0,3 0,2	2
II	0,36	0,7 0,09 0,054 0,04	2 0,5 0,3 0,2	3
III	0,5	0,36 0,074 0,05 0,032	2 0,5 0,3 0,2	5
IV	0,63	0,44 0,144 0,09 0,081	2 0,5 0,3 0,2	7
V	0,4	0,61 0,266 0,168 0,102	2 0,5 0,3 0,2	9
VI	0,29	0,67 0,24 0,16 0,13	2 0,5 0,3 0,2	12
VII	0,69	0,79 0,32 0,206 0,165	2 0,5 0,3 0,2	15

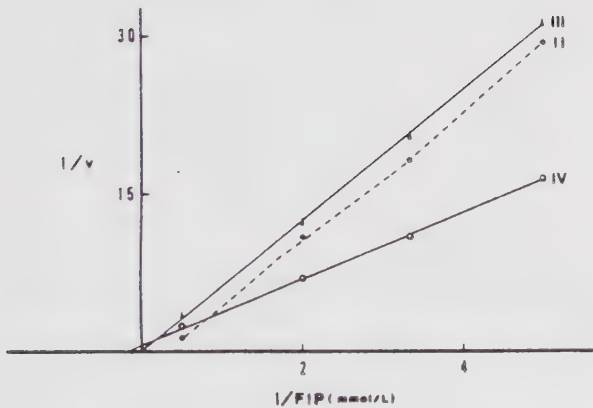


Abb.12: Lineweaver-Burk-Diagramm des 4. Versuchsdurchgangs

Abszisse: Kehrwert der Substratkonzentration (mmol/l);

Ordinate: Kehrwert der Reaktionsgeschwindigkeit
(nmol/min/mg Protein);

(●) : Graph der Kultur II; Inkubationsdauer 3 Tage

(▲) : Graph der Kultur III; Inkubationsdauer 5 Tage

(○) : Graph der Kultur IV; Inkubationsdauer 7 Tage

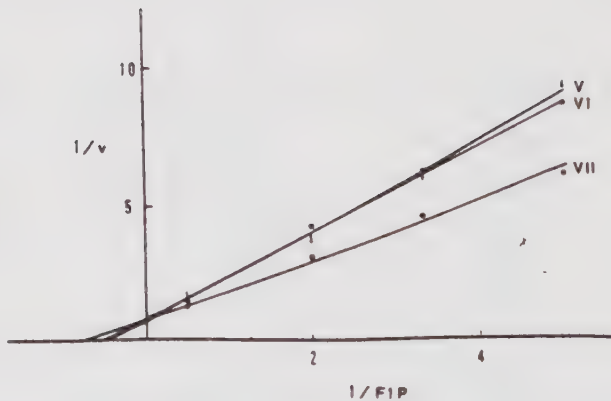


Abb.13: Lineweaver-Burk-Diagramm des 4. Versuchsdurchgangs

Abszisse: Kehrwert der Substratkonzentration (mmol/l)

Ordinate: Kehrwert der Reaktionsgeschwindigkeit
(nmol/min/mg Protein)

(▲) : Graph der Kultur V ; Inkubationsdauer 9 Tage

(■) : Graph der Kultur VI ; Inkubationsdauer 12 Tage

(●) : Graph der Kultur VII ; Inkubationsdauer 15 Tage

Tab.8: Aktivität der Aldolase gegenüber F1P
im 5. Versuchsdurchgang

Kultur Nr.	Protein mg/ml	Enzymaktivität nmol/min/mg Protein	Substrat mmol/l	Inkubations- tage
I	0,425	1,4 0,2 0,22 0,14	2 0,5 0,3 0,2	2
II	0,5	0,54 0,19 0,11 0,096	2 0,5 0,3 0,2	3
III	0,825	0,9 0,35 0,21 0,142	2 0,5 0,3 0,2	5
IV	1,2	0,72 0,31 0 0,162	2 0,5 0,3 0,2	7
V	0,8	0,94 0,41 0,21 0,214	2 0,5 0,3 0,2	9
VI	1,3	0,9 0,3 0,21 0,16	2 0,5 0,3 0,2	12
VII	1,0	0,8 0,35 0,25 0,18	2 0,5 0,3 0,2	15

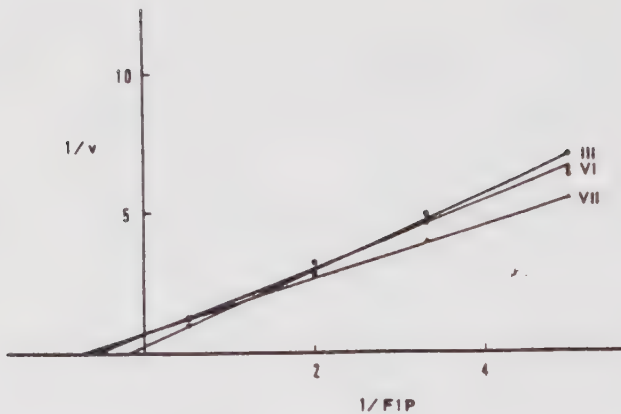


Abb.14: Lineweaver-Burk-Diagramm des 5. Versuchsdurchgangs

Abszisse: Kehrwert der Substratkonzentration (mmol/l)

Ordinate: Kehrwert der Reaktionsgeschwindigkeit
(nmol/min/mg Protein)

(●) : Graph der Kultur III; Inkubationsdauer 5 Tage

(■) : Graph der Kultur VI ; Inkubationsdauer 12 Tage

(▲) : Graph der Kultur VII; Inkubationsdauer 15 Tage

Tab.9: Aktivität der Aldolase gegenüber FIP
im 6. Versuchsdurchgang

Kultur Nr.	Protein mg/ml	Enzymaktivität nmol/min/mg Protein	Substrat mmol/l	Inkubations- tage
I	0,28	1,05 0,16 0,19 0,118	2 0,5 0,3 0,2	2
II	0,32	0,52 0,2 0,11 0,08	2 0,5 0,3 0,2	3
III	0,45	1,28 0,2 0,22 0,14	2 0,5 0,3 0,2	5
IV	0,71	0,8 0,21 0,15 0,1	2 0,5 0,3 0,2	7
V	0,345	0,8 0,29 0,22 0,13	2 0,5 0,3 0,2	9
VI	0,71	0,92 0,3 0,25 0,17	2 0,5 0,3 0,2	12
VII	0,5	1,35 0,39 0,25 0,12	2 0,5 0,3 0,2	15

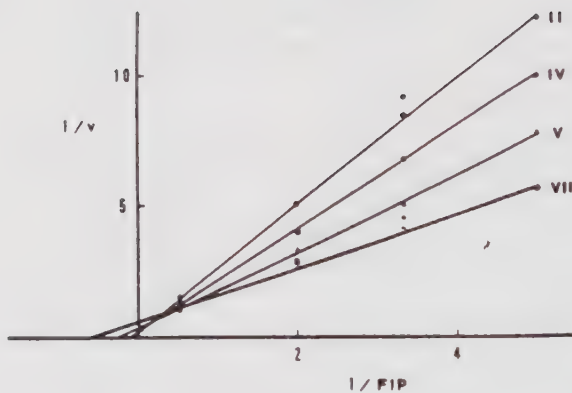


Abb.15: Lineweaver-Burk-Diagramm des 6. Versuchsdurchgangs

Abszisse: Kehrwert der Substratkonzentration (mmol/l)

Ordinate: Kehrwert der Reaktionsgeschwindigkeit
(nmol/min/mg Protein)

- (•) : Graph der Kultur II ; Inkubationsdauer 3 Tage
- (■) : Graph der Kultur IV ; Inkubationsdauer 7 Tage
- (▲) : Graph der Kultur V ; Inkubationsdauer 9 Tage
- (○) : Graph der Kultur VII ; Inkubationsdauer 15 Tage

Tab.10: Aktivität der F1P-Aldolase in Fibroblasten

Kultur Nr.	Tage ^x	n	Enzymaktivität ^{xx} (nmol/min/mg Protein)	K _m für Fruktose-1-P (mmol/l)
I	2	5	0,22 ± 0,038 (0,16 - 0,26)	nicht linear > 10
II	3	5	0,22 ± 0,053 (0,09 - 0,34)	nicht linear > 10
III	5	5	0,23 ± 0,14 (0,074 - 0,40)	nicht linear > 10
IV	7	5	0,25 ± 0,063 (0,15 - 0,31)	linear 4,5
V	9	6	0,364 ± 0,086 (0,27 - 0,53)	linear 2,5
VI	12	6	0,32 ± 0,075 (0,21 - 0,46)	linear 1,8
VII	15	6	0,42 ± 0,05 (0,32 - 0,58)	linear 1,43

^xAnzahl der Tage im Inkubator nach der letzten Abtrypsinierung

^{xx}Messung der Enzymaktivität bei 0,5 mM Fruktose-1-P im Endgemisch; Mittelwerte ± Standardabweichung
In den Klammern sind die Wertebereiche aufgeführt

n ist die Anzahl der Proben

4. DISKUSSION

Die hereditäre Fruktoseintoleranz ist eine der wenigen Stoffwechselkrankheiten, die bis jetzt weder in die Routinediagnostik bei Neugeborenen aufgenommen, noch hinsichtlich ihrer molekularen Mechanismen völlig erforscht werden konnte. Dies ist vor allem auf die Tatsache zurückzuführen, daß für eine Untersuchung frisches Leber- oder Darmgewebe notwendig ist, das man durch Nadel- oder Saugbiopsie in so geringen Mengen gewinnt, wie sie gerade zur Diagnosestellung mit der bisherigen spectrophotometrischen Methode ausreichen, während für die Diagnostik anderer Stoffwechseldefekte wie z.B. der Galaktosämie und Phenylketonurie Blut verwendet werden kann.

SHIN et al.(51) untersuchten Leukozyten von gesunden Kontrollpersonen, heterozygoten HFI-Trägern und homozygoten Patienten. Die Aldolasenaktivität zeigte keinen signifikanten Unterschied und war in den Leukozyten der homozygoten Patienten sogar etwas höher als in den beiden anderen Gruppen. Das Aldolasenaktivitätsverhältnis FDP/F1P war in allen Fällen größer als 7,0 was bedeutet, daß das Isoenzymmuster in Leukozyten fast ausschließlich von der Aldolase A und C bestimmt wird.

Dieselben Ergebnisse wie bei den Leukozyten erzielte man auch bei kultivierten Hautfibroblasten, die zum Zeitpunkt der Konfluenz untersucht wurden(51). Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen gesund, krank und heterozygot. Aber das Aktivitätsverhältnis FDP/F1P war mit Werten, die um 5,0 schwankten, niedriger als in Leukozyten, Muskel- oder Hirngewebe. Dies spricht für die Möglichkeit, daß die Aldolasenaktivität in Hautfibroblasten nicht nur auf Aldolase A oder C zurückzuführen ist, sondern auch auf Aldolase B. Berücksichtigt man die Ergebnisse zahlreicher Autoren, welche die ontogenetische Evolution der Aldolase-Isoenzymverteilung in bestimmten

Gewebe untersucht haben, so schien es möglich, daß ältere Fibroblastenkulturen proportional mehr Aldolase B enthalten könnten.

Es ist festgestellt worden, daß die Zelldifferenzierung mit einem Abfall der fetalen Isoenzyme, Aldolase A und C und einem gleichzeitigem Anstieg der Aldolase B verbunden ist(8, 17, 40, 54).

Beim Auftreten von B-haltigen Isoenzymen beobachtet man im Homogenat eine entsprechende Zunahme der Aktivität gegenüber FlP. In Extrakten der Niere konnte während der gesamten fetalen Entwicklung ein kontinuierlicher Anstieg der Aktivitätsverhältnisse Aldolase B / Aldolase A beobachtet werden. 10 Wochen nach der Geburt hatte die spezifische Aktivität der Aldolase B das adulte Niveau erreicht, d.h. sie war etwa 10 mal so hoch, wie diejenige, die 13 Wochen zuvor bestimmt wurde(57).

Doch auch mit anderen Methoden kam man zum gleichen Ergebnis. REHBEIN - THÖNER et al.(39) bestimmten Aldolase A, B und C durch Immuntitration in Extrakten von menschlicher Niere, Dünndarm und immunohistochemisch in Gewebeschnitten. Auch sie stellten mit beiden Techniken während der Entwicklung einen Wechsel des Isoenzymmusters fest, der von einem Überwiegen der Aldolase A zu einem Überwiegen der Form B führte.

Die histochemische Untersuchung zeigte, daß die Änderung des Aldolasemusters in den Organextrakten durch die Differenzierung der proximalen Tubuluszellen in der Niere und der Epithelzellen im Dünndarm verursacht wird. Besonders geeignet zu derartigen Untersuchungen ist der Dünndarm, an dem man mit einem Gewebeschnitt mehrere Entwicklungsstadien der Zellen untersuchen kann. Die Lebensspanne der Dünndarmzellen beträgt 5 Tage, in der die Zellen vom Grund der Krypte bis zur Zottenspitze wandern und sich differenzieren(54). Nach zahlreichen histochemischen

Untersuchungen kam man zu dem Schluß, daß die Konzentration der Aldolase B in der Epithelzelle des Dünndarms ansteigt, während die Zelle, auf ihrem Weg zur Zottenspitze, heranreift(54).

Dieselben qualitativen Ergebnisse wie bei der Niere lieferten Untersuchungen an der Leber. Aldolase A ist das überwiegende Enzym der fetalen Leber, während in der Erwachsenenleber fast ausschließlich Aldolase B vorkommt(10, 17, 19, 53).

Falls die verschiedenen Stadien der Isoenzymverteilung einen Zeitplan für die Differenzierung von epithelialen Zellen darstellen, wäre es naheliegend, den Sachverhalt auf die Karzinogenese zu übertragen, da man bis jetzt Tumorzellen für entdifferenzierte Zellen gehalten hat, deren Entwicklung einer Umkehr normaler Zelldifferenzierung entspricht. Tatsächlich kam man zu folgenden interessanten Ergebnissen:

In Hepatomen tauchen die fetalen Isoenzymformen Aldolase A und Aldolase C wieder auf, während Aldolase B fast völlig verschwindet(10, 20, 48, 53). Auch Untersuchungen am hypernephroiden Karzinom bestätigen, daß die Aldolase A während des Tumorwachstums zunimmt, die ursprünglich vorherrschende Aldolase B aber abnimmt(10, 21, 56). Es war bis jetzt nicht möglich durch histologische Untersuchungen zu entscheiden, ob der Verlust der gewebsspezifischen Morphologie einen Zufallsprozeß darstellt, oder aber eine einheitliche Änderung zur embryonalen Gewebsform hin. Die Untersuchung von Isoenzymen in Neoplasmen, wobei die Aldolase eine sehr wichtige Rolle spielt, weisen immer deutlicher darauf hin, daß die biochemischen Veränderungen in Tumoren nicht zufällig sind. Der Grad der morphologischen Änderung war im allgemeinen proportional dem Gehalt an fetalen Isoenzymformen(20). Außer der Aldolase wurden

noch andere Enzyme, wie die Pyruvatkinase, Laktatdehydrogenase, Glutaminase und Hexokinase untersucht und immer wurde bestätigt, daß viele qualitative Gemeinsamkeiten bestehen zwischen unreifen und neoplastischen Geweben(10). Äußerst interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse von GUILLOUZO et al.(20), der Ratten das Karzinogen 3-Me-DAB fütterte und feststellte, daß die Erhöhung des Aktivitätsverhältnisses FDP/F1P und damit die Produktion fetaler Aldolasen dem Erscheinen des Karzinoms sogar vorausgeht.

Man sollte an dieser Stelle noch erwähnen, daß das Phänomen des Rückschritts zum fetalen Enzymmuster zwar besonders ausgeprägt in Hepatomen und überhaupt im Karzinomgewebe ist, daß es aber nicht ausschließlich auf die Karzinogenese beschränkt ist. SCHAPIRA et al.(48) stellten fest, daß die Aldolase, die Laktatdehydrogenase und die Kreatinkinase auch im atrophierten Muskel eine fetale Isoenzymform annehmen.

Auf Grund früherer Untersuchungen der katalytischen Eigenschaften der Aldolase A, B und C erscheint der Umschwung im Isoenzymmuster zweckmäßig und erklärbar, da die Aldolase A am ehesten den metabolischen Bedürfnissen von undifferenzierten, sich schnell teilenden Zellen entspricht. Zellteilung benötigt viel Energie. Da Glukose die Hauptenergiequelle des fetalen Metabolismus ist, kann eine hohe Glykolyserate in diesen Zellen erwartet werden. Aldolase A ist dem glykolytischen Stoffwechselweg am besten angepaßt, da es die höchste FDP - Spaltungsaktivität besitzt. Im Gegensatz dazu hat Aldolase B eine verhältnismäßig geringe spezifische Aktivität was FDP betrifft, dafür favorisiert sie den glukoneogenetischen Stoffwechselweg(39). Aldolase C nimmt eine Zwischenstellung ein(11). Enzyme spiegeln die speziellen Stoffwechselwege einer Zelle wider und tun so ihren Bedürfnissen genüge(57).

Leider ist es nach unserer Erfahrung nicht möglich, mit spezifischen Antikörpern (Merck) die Aktivität der einzelnen Isoenzyme zu hemmen, um so Aldolase A, B oder C besser differenzieren zu können. GITZELMANN et al. (15) kamen zu demselben Ergebnis, als sie Antiserum von immunisierten Meerschweinchen mit Leberhomogenat von Gesunden und HFI - Patienten reagieren ließen. Die Inaktivierung von Aldolase B war unvollständig und in drei von fünf HFI-Extrakten fand sogar eine Aktivierung von F1P-Aldolase statt.

Die Tatsache, daß in fetaler Niere und Leber, wie auch in Karzinomgewebe, hauptsächlich Aldolase A vorkommt im Gegensatz zu gesundem, adulten Gewebe, ließ es möglich erscheinen, daß ältere Hautfibroblastenkulturen proportional mehr Aldolase B enthalten.

Bestimmt man die Michaelis-Menten-Konstante so wird ausnahmslos bei allen unseren Versuchsdurchgängen deutlich, daß diese mit dem Alter der Fibroblastenkulturen sinkt, folglich die Affinität der Aldolase zu F1P steigt. Aldolase B hydrolysiert F1P und FDP in derselben Geschwindigkeit, während Aldolase A F1P etwa 50x langsamer als FDP hydrolysiert (57). Eine Messung der spezifischen Aktivität gegenüber F1P läßt deshalb eine Abschätzung der relativen Menge der beiden Monomertypen zu und ein Anstieg der Affinität gegenüber F1P kann als Anstieg der Aldolase B im Homogenat interpretiert werden.

Die Proteinmessung spiegelte die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellkulturen wider, die erwartungsgemäß in den ersten 7 Inkubationstagen exponentiell verläuft und ab dem 9. Tag linear ist. Anlaß zur Diskussion ist der Abfall der Proteinmenge von Kultur IV zu Kultur V. Die Erklärung ist unserer Meinung nach am ehesten in einem

Zelluntergang zu suchen, der durch die hohe Zelldichte und der damit verbundenen schlechten Diffusion des Nährmediums bedingt ist.

Die verhältnismäßig eindeutige Symptomatik der hereditären Fruktoseintoleranz zusammen mit Karenz- bzw. Provokationstests ermöglichen frühzeitig die klinische Verdachtsdiagnose. Zur laborchemischen Sicherung mit der spectrophotometrischen Methode sind jedoch invasive Gewebsentnahmen notwendig. Wäre es möglich in weiteren Untersuchungen nachzuweisen, daß sich der Mangel an Aldolase B bei HFI auch in ausgereiften Fibroblasten manifestiert, so ergäbe sich damit ein neuer Weg der Diagnosestellung. Die Technik, Zellkulturen als Untersuchungsmaterial an Stelle von Gewebshomogenaten zu verwenden, würde entscheidende Vorteile besitzen:

Wie wir auf Grund unserer Untersuchungen festgestellt haben, steigt mit der Dauer der Kultivierung, die Menge an adultem Isoenzym. Die Aldolase B und damit die Affinität gegenüber F1P rückt in meßbare Bereiche.

Im Inkubator vermehren sich die Zellen und damit auch das verfügbare Untersuchungsmaterial. Gelingt es Zellkulturen als Grundlage für HFI - Diagnostik zu verwenden, könnten Biopsien zur Probengewinnung vermieden werden.

Die Untersuchung von einer Zellart statt Gewebshomogenaten ist ein entscheidender Schritt zu größerer Genauigkeit. Insbesondere bei zirrhotisch veränderten, oder länger eingefrorenem Lebergewebe als Untersuchungsmaterial, kommt es wegen der allgemein herabgesetzten Enzymaktivität zu falsch positiven Diagnosen. Selbst bei der Untersuchung von gesundem Dünndarmgewebe kann das Ergebnis durch die Lokalisation der Biopsie beeinflusst werden, da die Konzentration der Aldolase B in

der Epithelzelle des Dünndarms, auf ihrem Weg von der Krypte zur Zottenspitze, ansteigt(54).

Vor allem, um das Problem der Änderung im Isoenzymmuster während der Ontogenese noch genauer zu untersuchen, sollte man die alte Technik, Gewebshomogenat als Material zu verwenden, verlassen. In einem bestimmten Stadium der Differenzierung muß eine Änderung der Enzymsynthese in der Zelle stattfinden, die zu dem spezifischen Isoenzymmuster des adulten Organs führt. In der Vergangenheit untersuchten die meisten Autoren diesen Sachverhalt durch die Analyse von Organhomogenaten. Organe sind jedoch immer aus einer Vielzahl von Zelltypen zusammengesetzt, von denen jeder auf seine Aufgabe metabolisch spezialisiert ist. Sie unterscheiden sich außerdem in ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber pathologischen Organveränderungen und gegenüber den Bedingungen, die bei der Lagerung des Probenmaterials herrschen. So können nach unserer Erfahrung genaue Erkenntnisse über die molekularen Ereignisse entwicklungsbedingter Änderungen nur durch die Analyse dieser Veränderungen auf dem zellulären Niveau erworben werden, wobei die alte Technik, Gewebshomogenat als Material zu verwenden, modifiziert werden muß.

Es bestehen nämlich zwei Möglichkeiten den Umschwung in der Isoenzym synthese zu interpretieren:

- a) Dieselbe Zelle produziert alle drei Isoenzymtypen der Aldolase und ändert im Laufe der Differenzierung lediglich die Mengenverhältnisse in der Synthese
- b) Die andere Möglichkeit diesen Umbruch im Verhältnis der Monomertypen zu erklären wäre, daß sich die relative Menge verschiedener Zelltypen ändert, von denen jeder ein charakteristisches Enzymmuster besitzt.

WACHSMUTH et al.(57) versuchte mit kinetischen Untersuchungen dieses Problem zu lösen. Er kam zu dem Ergebnis, daß die einzelne Zelle während ihres Reifungsprozesses ihr Isoenzymmuster verändert und daß alle Zellen sowohl Aldolase A, als auch Aldolase B in definierten Konzentrationen enthalten, abhängig von ihrem Reifezustand.

Auch unsere Ergebnisse sind mit diesem Resultat in Einklang zu bringen. Wir verwendeten die Gewebeskultur als Technik, womit wir ausschlossen, daß unterschiedliche Zelltypen unsere Untersuchungen beeinflussten. Die Abnahme von Aldolase A und die Zunahme von Aldolase B wurde in allen Versuchsdurchgängen deutlich, womit ein Hinweis dafür erbracht ist, daß der Wechsel in der Synthese der spezifischen Aldolasetypen in einem bestimmten Differenzierungsstadium der einzelnen Zelle stattfindet, unabhängig vom Entwicklungsstadium des gesamten Organs.

Die Untersuchungen an Fibroblastenkulturen ließen uns an die Grenzen der bisher gängigen spectrophotometrischen Methode stoßen, vor allem, was die nicht mehr meßbare Aldolasenaktivität gegenüber F1P und die großen Materialmengen betraf. Wir wandten deshalb eine neue spezifische und sensitive Methode nach SHIN et al.(49, 50) an, die von zentraler Bedeutung für unsere Untersuchungen war und deren Vorzüge nochmals kurz zusammengefaßt werden sollten:

Im Überschuß vorhandenes radioaktiv markiertes F1P wird von der Aldolase, die im Untersuchungsmaterial enthalten ist, in die beiden Triosen Dihydroxyacetonphosphat und radioaktives Glycerinaldehyd gespalten (3, 8). Es herrscht ein Gleichgewichtsverhältnis

zwischen beiden Reaktionsprodukten(8). Mit der Ionenaustauschchromatographie kann das radioaktiv markierte Glycerinaldehyd von Dihydroxyacetonphosphat und F1P getrennt und anschließend gemessen werden. Das entstandene Glycerinaldehyd dient als Maß der Aldolasenaktivität gegenüber F1P und wird in nmol Glycerinaldehyd/min/mg Protein angegeben.

Dieses Verfahren ist relativ billig, da es nur eine minimale Menge an Radioaktivität erfordert und das radioaktive F1P aus der im Handel befindlichen radioaktiven Fruktose selbst hergestellt werden kann(52). Die Mikrosäulenchromatographie ermöglicht eine große Anzahl Versuche gleichzeitig und in kurzer Zeit durchzuführen. Ein unschätzbarer Vorteil gegenüber der alten spectrophotometrischen Methode liegt auch in der sehr geringen Menge an benötigtem Probenmaterial. Waren bisher 3 - 5 mg Untersuchungsmaterial nötig, genügen bei der radioaktiven Methode schon weniger als 100 µg je Probe.

Auch in niedrigen Meßbereichen sind die Werte sehr gut reproduzierbar und spiegeln die Genauigkeit dieser neu entwickelten Methode wider. Dies wäre für die Diagnostik der hereditären Fruktoseintoleranz von Bedeutung bei der die Aldolasenaktivität in den Patientenproben sehr gering ist(11, 23, 34, 45), vorausgesetzt weitere Untersuchungen würden den Nachweis erbringen, daß der Defekt auch in ausgereiften Fibroblasten repräsentiert ist, was nicht bei allen Stoffwechselkrankheiten der Fall ist. Besteht auf zellulärem Niveau ein Unterschied zwischen Gesunden und HFI-Patienten, so käme er möglicherweise durch Zellkultivierung in meßbare Bereiche. Damit würde sich ein neuer Weg der Diagnosestellung eröffnen wobei ein Nachteil darin besteht, daß dieses neue Verfahren ein gut

ausgestattetes Zellabor voraussetzt in dem das Untersuchungsmaterial entsprechend aufbereitet werden kann. Die lange Dauer, die vor allem durch die Inkubationszeit bedingt ist, dürfte von untergeordneter Bedeutung sein, da schon die klinische Verdachtsdiagnose genügen sollte um eine entsprechende diätetische Therapie einzuleiten.

Die Untersuchung der Isoenzyme, wobei die Aldolase eine besonders wichtige Rolle spielt, hat einen neuen Zugang geschaffen zu den Problemen, die Zelldifferenzierung und Karzinogenese betreffen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Aldolasenaktivität gegenüber F1P wurde in Zellen nach einer radiometrischen Methode gemessen. Als Untersuchungsmaterial verwandten wir insgesamt 14 Fibroblastenkulturen, die während unterschiedlicher Zeiträume von 2 bis 15 Tagen nach dem letzten Abtrypsinierungsvorgang kultiviert worden waren.

Die Zellvermehrung während der Inkubationszeit äußerte sich in einer Steigerung der Proteinwerte. Dem exponentiellen Anstieg auf das zweifache des Initialgehaltes innerhalb der ersten 5 Tage folgte nach einem kurzfristigen, wahrscheinlich kulturbedingtem Abfall, eine lineare Zunahme während der letzten 6 Tage.

Die Verschiebung des Aldolaseisoenzymmusters während der Fibroblastendifferenzierung schlug sich in einer wachsenden Aldolasenaktivität gegenüber F1P nieder. Besonders bei einer Substratkonzentration von 0,5 mM F1P wurde deutlich, daß mit der Dauer der Kultivierung die Menge an synthetisierter Aldolase B stieg. Nach 15 Inkubationstagen war eine Steigerung der Umsatzrate um annähernd 100% meßbar.

Auch die Enzymkinetik bestätigte, daß die Affinität der Aldolase gegenüber F1P stieg. Nach 15 Inkubationstagen sank der K_m -Wert auf 1/10 des Initialwertes. Bei der graphischen Darstellung im Lineweaver-Burk-Diagramm ergaben sich hyperbole Kurven für die kurzfristig kultivierten Zellen, während sich für die längerfristig inkubierten, reiferen Fibroblasten, Geraden ergaben, da die Reaktionsgeschwindigkeit mit der Substratkonzentration linear stieg.

Alle unsere Ergebnisse bestätigen somit, daß mit der Dauer der Kultivierung die Fibroblasten proportional mehr Aldolase B enthalten.

6.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BAERLOCHER, K., GITZELMANN, R., STEINMANN, B.:
Clinical and genetic studies of disorders in fructose metabolism. In: Inherited disorders of carbohydrate metabolism. Herausgegeben von Burmann, D., Holton, J. B., Penneck, C. A., MTP Press, Lancaster, England 163-190, (1980)
2. BAERLOCHER, K., GITZELMANN, R., STEINMANN, B., GITZELMANN-GUMARASAMY, R.: Hereditary fructose intolerance in early childhood: a major diagnostic challenge. Survey of 20 symptomatic cases. *Helv. Paediatr. Acta* 33, 465, (1979)
3. BARROWS, C. H. jun., KOKKONEN, G. C.:
The effect of induction of aldolase on the livers of senescent mice. *Age* 4, 1-3, (1981)
4. BLOSTEIN, R., RUTTER, W. J.:
Comparative studies of liver and muscle aldolase; immunochemical and chromatographic differentiation.
J. Biol. Chem. 238, 3280-3285, (1963)
5. CHAMBERS, R. A., PRATT, R. T.:
Idiosyncrasy to fructose. *Lancet* 2, 340, (1956)
6. CORI, G. T., OCHOA, S., SLEIN, M. W., CORI, C. F.:
The metabolism of fructose in liver. Isolation of fructose-1-phosphate and anorganic pyrophosphate.
Biochim. Biophys. Acta 7, 304-317, (1951)
7. COX, T. M., CAMILLERI, M., O'DONELL, M. W., CHADWICK, V. S.:
Pseudodominant transmission of fructose intolerance in an adult and three offspring; heterozygote detection by intestinal biopsy. *N. Engl. J. Med.* 307, 537-542, (1982)
8. DRECHSLER, E. R., BOYER, P. B., KOWALSKY, A. G.:
The catalytic activity of carboxypeptidase-degraded aldolase.
J. Biol. Chem. 234, 2627-2634, (1959)

9. DUBOI, R., LOEB, H., OOMS, H.A., GILLET, P., BARTMAN, J.,
CHAMPENOIS, A.: Etudes d'un cas d'hypoglycémie fonctionnelle par intolérance au fructose.
Helv. Paediat. Acta 16, 90-96, (1961)
10. FARRON, F., HSU, H.H.T., KNOX, E.:
Fetal-type isoenzymes in hepatic and nonhepatic rat tumors.
Cancer Res. 32, 302-308, (1972)
11. FROESCH, E.R.:
Essential fructosuria and hereditary fructose intolerance.
In: The metabolic basis of inherited disease. Herausgegeben von Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S.,
Mc Graw-Hill, New York, 121-136, (1966)
12. FROESCH, E.R.:
Fruktosurie und Fruktoseintoleranz. In: Genetic defects of biologically active proteins. Herausgegeben von Linneweh, F Urban und Schwarzenberg, München und Berlin, 242-254, (1962)
13. FROESCH, E.R., PRADER, A., LABHART, A., STUBER, H.W., WOLF, H.P.:
Die hereditäre Fruktoseintoleranz, eine bisher nicht bekannte kongenitale Stoffwechselstörung.
Schweiz. Med. Wochenschr., 87, 1168-1171, (1957)
14. FROESCH, E.R., WOLF, H.P., BAITSCH, H., PRADER, A., LABHART, A.:
Hereditary fructose intolerance. Am. J. Med. 34, 151-167, (1963)
15. GITZELMANN, R., STEINMANN, B., BALLY, C., LEBHERZ, H.G.:
Antibody activation of mutant human fructose diphosphate aldolase B in liver extracts of patients with hereditary fructose intolerance.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 1270-1277, (1974)
16. GLIKSMAN, R., GAOSH, N.K., COX, R.F.:
Comparison of aldolase isoenzymes in placentas, hela cells and human fibroblast cultures. Enzyme 22, 416-419, (1977)

17. GREGORI, C., BESMOND, C., KAHN, A., DREYFUS, J.C.:
Characterization of messenger RNA for aldolase B in
adult and fetal human livers.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 104, 369-375, (1982)
18. GREGORI, C., SCHAPIRA, F., KAHN, A., DELPECH, M., DREYFUS, J.C.:
Molecular studies of liver aldolase B in hereditary fruc-
tose intolerance using blotting and immunological techniques.
Ann. Hum. Genet. 46, 281-292, (1982)
19. GUGUEN-GUILLOUZO, C., SZAJNERT, M.E., GLAISE, D., GREGORI, C.,
SCHAPIRA, F.: Isoenzyme differentiation of aldolase and
pyruvate kinase in fetal regenerating, preneoplastic and
malignant rat hepatocytes during culture.
Vitro 17, 369-377, (1981)
20. GUILLOUZO, A., WEBER, A., LE PROVOST, E., RISSEL, M., SCHAPIRA, F.
Cell types involved in the expression of foetal aldolases
during rat azo-dye hepatocarcinogenesis.
J. Cell Sci. 49, 249-260, (1981)
21. HATZFELD, A., FELDMANN, G., GUESNON, J., FRAYSSINET, C.,
SCHAPIRA, F.: Location of adult and fetal aldolases A, B and
C by immunoperoxidase technique in LF fast-growing rat
hepatomas. Cancer Res. 38, 16-22, (1978)
22. HEINZ, F., SCHLEGEL, F., KRAUSE, P.H.:
Enzymes of fructose metabolism in human small intestine
mucosa. Enzyme 12, 93-101, (1975)
23. HERS, A.G., JOASSIN, G.:
Anomalie de l'aldolase hepatique dans l'intolerance au
fructose. Enzymol. Biol. Clin. 1, 4-41, (1961)
24. KARLSON, P.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Georg-Thieme-Verlag,
Stuttgart, 10. Auflage, 241-265, (1977)

25. KELLEN, J.A., CHAN, A., CAPLAN, B., MALKIN, A.:
Aldolase isoenzyme patterns during human ontogeny and
in lung, kidney and breast cancer.
Enzyme 25, 228-235, (1980)
26. KÖHLIN, P., MELIN, K.:
Hereditary fructose intolerance in four Swedish families.
Acta Paediatr. Scand. 57, 24-32, (1968)
27. KOSTER, J.F., SLEE, R.G., FERNANDES, J.:
On the biochemical basis of hereditary fructose intolerance.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 64, 289-294, (1975)
28. LELONG, M., ALAGILLE, D., GENTIL, J., COLIN, J., MERCIÉ, C.,
TUPIN, J., BOUQUIR, J.: L'intolérance héréditaire au fructose.
Arch. franc. pédiat. 19, 841-850, (1962)
29. LEMONNIER, F., GREGORI, C., SCHAPIRA, F.:
Possible role of thiol groups in the abnormal kinetics
of aldolase in hereditary fructose intolerance.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 61, 306-312, (1974)
30. LOEFFLER, G., PETRIDES, P.E., WEISS, L., HARPER, H.A.:
Physiologische Chemie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg,
New York, 2. Auflage 157-190, (1979)
31. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275, (1951)
32. MIWA, S., FUJII, H., TANI, K., TAKANASHI, K., TAKEGAWA, S.,
KUFO, M., FUJINANI, N., SAKURAI, M., TANIMOTO, Y., KATO, T.,
MATSUNO, N.: Two cases of red cell aldolase deficiency
associated with hereditary hemolytic anemia in a Japanese
family. Am. J. Hematol. 11, 425-437, (1981)

33. MORRIS, R.C., UEKI, I., LOH, D., EANES, R.Z., McLIN, P.:
Absence of renal fructose-1-phosphate-aldolase activity
in hereditary fructose intolerance.
Nature 214, 920-921, (1967)
34. NIKKILÄ, E.A., SOMERSALO, O., PITKANEN, E., PERHEENTUPA, J.:
Hereditary fructose intolerance, an inborn deficiency
of liver aldolase complex. *Metabolism* 11, 727-731, (1962)
35. NORDMANN, Y., SCHAPIRA, F., DREYFUS, J.C.:
A structurally modified liver aldolase in fructose into-
lerance, immunological and kinetic evidence.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 31, 884-889, (1968)
36. PENHOET, E., RAYKUMAR, T., RUTTER, W.J.:
Multiple forms of fructose diphosphate aldolase in mamma-
lian tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 56, 1275-1282, (1966)
37. PHILLIPS, M.J., LITTLE, J.A., PTAK, T.W.:
Subcellular pathology of hereditary fructose intolerance.
Am. J. Med. 44, 910-921, (1968)
38. RAIVIO, K., PERHEENTUPA, J., NIKKILÄ, E.A.:
Aldolase activities in the liver in parents of patients
with hereditary fructose intolerance.
Clin. Chim. Acta 17, 275-279, (1967)
39. REHREIN-THÖNER, M., PFLEIDERER, G.:
The changes in aldolase isoenzyme pattern during develop-
ment of the human kidney and small intestine, demonstrated
in organ extracts and tissue sections.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 169-180, (1977)
40. RENSING, U., SCHMID, A., LEUTHARDT, F.:
Veränderungen im Isoenzymmuster der Aldolasen aus Ratten-
organen während der Entwicklung.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 921-928, (1967)

41. ROE, J.H., EPSTEIN, J.H., GOLDSTEIN, N.P.:
A photometric method for the determination of insulin
in plasma and urine. *J. Biol. Chem.* 178, 839-845, (1949)
42. RUTTER, W.J., RICHARDS, O.C., WOODFIN, B.M.:
Comparative studies of liver and muscle aldolase; effect
of carboxypeptidase on catalytic activity.
J. Biol. Chem. 236, 3193-3197, (1961)
43. SAMOLS, E., DORMANDY, T.L.:
Insulin response to fructose and galactose.
Lancet 1, 478-479, (1963)
44. SCHAPIRA, F.:
Isoenzymes and Cancer. *Adv. Cancer Res.* 18, 77-99, (1973)
45. SCHAPIRA, F.:
Kinetic and immunological abnormalities of aldolase B
in hereditary fructose intolerance.
Biochem. Soc. Transactions 2, 232-234, (1975)
46. SCHAPIRA, F., GREGORI, C., HATZFELD, A.:
Isoelectrofocusing of aldolase B from normal human livers
and from livers with hereditary fructose intolerance.
Clin. Chim. Acta 78, 1-8, (1977)
47. SCHAPIRA, F., HATZFELD, A., GREGORI, C.:
Studies on liver aldolases in hereditary fructose
intolerance. *Enzyme* 18, 73-83, (1974)
48. SCHAPIRA, F., HATZFELD, A., WEBER, A.:
Resurgence of some fetal isoenzymes in hepatoma.
In: *Isozymes. Herausgegeben von Markert, C.L.*,
Acad. Press III, 987-1001, (1975)

49. SHIN, Y.S., MORO, V., DOLIWA, H., ENDRES, W.:
A radioisotopic method for fructose-1-phosphate
aldolase assay that facilitates diagnosis of heredi-
tary fructose intolerance.
Clinical Chemistry 29, 1955-1958, (1983)
50. SHIN, Y.S., OSANG, M., ZIEGLER, R., SCHAUB, J.:
A simple assay for galaktokinase using DEAE-cellulose
column chromatography. Clin. Chim. Acta 74, 1-5, (1977)
51. SHIN, Y.S., RIMBÖCK, H., ENDRES, W.:
Fructose-1-phosphate aldolase activity in human fetal
and adult tissues as well as leucozytes and cultured
fibroblasts in hereditary fructose intolerance.
J. Inher. Metab. Dis. 5, Suppl. 1, 45-46, (1982)
52. STAUB, A., VESTLING, C.S.:
Studies on fructose-1-phosphate with rat liver frukto-
kinase. J. Biol. Chem. 194, 395-399, (1951)
53. TSUTSUMI, K., ISHIKAWA, K.:
Purification of messenger RNA coding for rat liver
aldolase B subunit.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 100, 407-412, (1981)
54. WACHSMUTH, E.D.:
Differentiation of epithelial cells in human jejunum;
localization and quantification of aminopeptidase,
alkaline phosphatase and aldolase isozymes in tissue
sections. Histochemistry 48, 101-109, (1976)
55. WACHSMUTH, E.D.:
The localization of enzymes in tissue sections by
immunohistochemistry. Conventional antibody and mixed
aggregation techniques. Histochem. J. 8, 253-270, (1976)

56. WACHSMUTH, E.D., STOYE, J.P.:
A classification of tumor development based on an analysis of enzymes in tissue sections of hypernephroid carcinoma in man. Beitr. Path. 159, 229-248, (1976)
57. WACHSMUTH, E.D., STOYE, J.P.:
The differentiation of proximal and distal tubules in the male rat kidney; the appearance of aldolase isozymes, aminopeptidase and alkaline phosphatase during ontogeny. Histochemistry 47, 315-336, (1976)
58. WOLF, H.P., LEUTHARDT, F.:
Die Aldolasespaltung von Fruktose-1-phosphat und Fruktosediphosphat in der Niere.
Helv. Chim. Acta 40, 1033, (1957)
59. WOODS, H.F.:
Pathogenic mechanisms of disorders in fructose metabolism. In: Inherited disorders of carbohydrate metabolism. Herausgegeben von Burmann, D., Holton, J.B., Fennock, C.A., MTP Press, Lancaster, England 191-201, (1980)
60. WOODS, H.F., EGGLESTON, L.V., KREBS, H.A.:
The cause of hepatic accumulation of fructose-1-phosphate on fructose loading. Biochem. J. 119, 501-510, (1970)
61. ZÖLLNER, N., HEUCKENKAMP, P.U., NECHWATAL, W.:
Über die Verwertung und renale Ausscheidung von Fruktose während ihrer langdauernden intravenösen Zufuhr.
Klin. Wochenschr. 46, 1300, (1968)

Lebenslauf

Name: Christina-Anna Bayer

Geburtsdatum: 4. Juli 1961

Geburtsort: 8495 Wetterfeld, Krs. Cham

Eltern: August und Elfriede Bayer, geb. Hoffmann

1967 - 1971 Vokasschule in München
an der Hinterbärenbadstraße

1971 - 1979 Luisengymnasium München

1979 Abitur

WS 1979/80 Beginn des Studiums der Humanmedizin
an der LMU. München

SS 1981 Ärztliche Vorprüfung

SS 1982 Staatsexamen I

SS 1984 Staatsexamen II

Nov. 1985 Staatsexamen III

Dez. 1985 Approbation

